

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biitekniikka

2011

Mervi Laanti

VIRUSVASTA-AINEIDEN SEULONTA SYNTEETTISISTÄ VASTA-AINEKIRJASTOISTA



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Mervi Laanti

VIRUSVASTA-AINEIDEN SEULONTA SYNTEETTISISTÄ VASTA-AINEKIRJASTOISTA

Coxsackievirus A7 (CAV7) ja coxsackievirus A9 (CAV9) ovat molemmat pikornaviruksiin kuuluvia, ihmiselle tautia aiheuttavia enterovirusia. CAV7 on aiheuttanut muun muassa aivokalvontulehdusta ja halvausepidemioita, mutta on nykyisin melko harvinainen. CAV9 on yleinen ihmispatogeeni, joka aiheuttaa lievien hengitystieinfektioiden lisäksi muun muassa sydänlihaskalvontulehduksia.

Tämän työn tarkoituksena oli optimoida enterovirusten puhdistusmenetelmää ja tarkastella viruksen saantoa puhdistuksen eri vaiheissa sekä käyttää puhdistettuja viruksia faagi-vasta-aineiden seulonnassa synteettisistä scFv-kirjastoista.

Viruspuhdistuksessa sovellettiin ultrasuodatusta viruksen osittaiseen puhdistukseen ja konsentrointiin perinteisemmän PEG-saostuksen ja CsCl-gradienttijaon rinnalla. Puhdistuksen eri vaiheista kerättiin näytteitä, joiden infektiivisyys määritettiin soluilla ja puhtaus geelillä. Saatujen tulosten perusteella havaittiin, että ultrasuodatus nopeuttaa viruspuhdistusprosessia, kun tarvitaan mahdollisimman infektiivistä viruspreparaattia ja virus on suhteellisen puhdasta ultrasuodatuksen jälkeen.

Vasta-aineseulonnassa CAV9:lle ei onnistuttu löytää hyviä sitoja vasta-ainekirjastosta, jolloin päätettiin muutamien selektioiden jälkeen keskittyä ainoastaan CAV7:aan. CAV7:lle löydettiin muutamia hyviä sitoja, joita voisi jatkossa rikastaa uusilla pännäyskierroksilla. CAV7:lle löydettyjä sitoja voisi puhdistaa vasta-aineen testauksia varten. Pikornavirusvasta-aineita voitaisiin ylipäänsä testata elävissä soluissa *in vitro* tai hiirissä *in vivo*, muun muassa neutralisaatiotesteillä ja kokeilla siten virusinfektion estoa. Humaanivasta-ainekirjastot mahdollistavat virusvasta-aineiden käytön myös ihmisissä.

ASIASANAT:

Enterovirukset, faaginäyttötekniikka, pikornavirukset, vasta-ainekirjasto, viruspuhdistus

Mervi Laanti

SELECTION OF VIRAL ANTIBODIES FROM PHAGE DISPLAY LIBRARY

Coxsackievirus A7 (CAV7) and coxsackievirus A9 (CAV9) are both members of the genus *Enterovirus* in the family *Picornaviridae*. CAV7 has caused meningitis and flaccid paralysis but today it is a rare type. CAV9 causes respiratory infections but also meningitis and myocarditis.

The objective of this study was to optimize enterovirus purification and examine virus yield during the purification process. Purified viruses were used in binder selection against phage display antibody library.

Coxsackievirus A9 was purified using PEG concentration and on cesium chloride gradient centrifugation, and followed by dialysis of virus bands. Ultrafiltration was also tested in virus concentration and purification. Samples were collected from each purification step, infectivity was tested on cells and purity was checked by SDS-PAGE. PEG concentration resulted in significant loss of particle infectivity. It was found that the total amount of recovered virus in the ultrafiltrated concentrate was somewhat greater than in the ultracentrifuged virus preparation.

Phage scFvs were obtained after three rounds of selection against immobilized virus antigen. The phage scFv gave low enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) values with CAV9. So in further studies studies concentrated only on CAV7. A few good binders against CAV7 were isolated from phage display library. In the future CAV7 binders could be enriched and purified for antibody testing. Binding and ability to neutralize virus infection by picornavirus antibodies could generally be tested *in vitro* on live cells or *in vivo* in mice. In general human antibody libraries enable the use of virus antibodies in humans.

KEYWORDS:

Antibody library, enterovirus, picornavirus, phage display, virus purification

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	7
1 JOHDANTO	6
1.1 Pikoravirukset	7
1.2 Vasta-ainekirjasto	8
1.3 Faaginäyttökone	9
2 AINEISTO JA MENETELMÄT	13
2.1 Virustuotto ja puhdistus	14
2.1.1 Menetelmän periaate	14
2.1.2 Solulinjat	14
2.1.3 Työn suoritus	15
2.2 Suora titraus	16
2.2.1 Menetelmän periaate	16
2.2.2 Työn suoritus	17
2.3 SDS-PAGE	17
2.3.1 Menetelmän periaate	17
2.4 Vasta-aineen affiniteettipuhdistus	19
2.4.1 Menetelmän periaate	19
2.4.2 Työn suoritus	19
2.5 Immunosytokemia	20
2.5.1 Menetelmän periaate	20
2.5.2 Työn suoritus	20
2.6 Faaginäyttökoneeseen perustuva vasta-aineseulonta	21
2.6.1 Menetelmän periaate	21
2.6.2 Levyjen pinnoitus	23
2.6.3 Sitoutumisselektio	23
2.6.4 Spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla	24
2.6.5 Sijojen testaus	25
3 TULOKSET	26
3.1 Viruspuhdistus	26
3.2 Immunosytokemia	30
3.3 Vasta-aineen sitoutumiskoe	33
3.4 Vasta-aineseulonta vasta-ainekirjastosta	33

3.4.1	Spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla	34
3.4.2	Sitojen testaus	34
4	TULOSTEN TARKASTELU	39
4.1	Viruspuhdistus	39
4.2	Vasta-aineseulonta	39
	LÄHTEET	41

LIITTEET

Liite 1.	Liuosten valmistusohjeet
Liite 2.	Soluviljelyssä käytetyt liuokset ja solujen hoito
Liite 3.	Solujen fiksaus sekä vasta-aine- ja tumavärjäykset
Liite 4.	Vasta-aineiden sitoutumiskoe viruksiin <i>in vitro</i>
Liite 5.	Vasta-aineseulonnan periaate
Liite 6.	CAV7 spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla
Liite 7.	CAV9 spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla

KUVAT

Kuva 1:	Kokonainen vasta-ainemolekyyli (IgG) ja vasta-ainefragmentteja (Fab, Fv ja single chain Fv)	8
Kuva 2:	Faaginäyttötekniikkaan perustuvan vasta-aineseulonnan periaatekuva	10
Kuva 3 :	Kuoppalevyn pintaan kiinnittyvien fuusioproteiinia ekspressoivien faagien seulonta eli pännäys	11
Kuva 4:	CsCl-gradienttimenetelmällä saatu CAV9-vyöhyke	28
Kuva 5:	SDS-PAGE geeli	29
Kuva 6:	CAV9-profiili A549-soluissa	31
Kuva 7:	CAV9-profiili A549-soluissa	32
Kuva 8:	CAV7-profiili A549-soluissa	33
Liitteessä:		
Kuva 9:	Vasta-aineseulonnan periaate	5

KUVIOT

Kuvio 1:	Kaaviokuva työvaiheista	13
Kuvio 2:	Kaaviokuva vasta-aineseulonnan vaiheista ja ohjeellisesta aikataulusta	22
Kuvio 3:	CAV9 toisen seulontakierroksen tulosten vertailu eri laimennoksilla.	35
Kuvio 4:	CAV7 toisen seulontakierroksen tulosten vertailu.	36
Kuvio 5:	CAV7 kolmannen seulontakierroksen tulosten vertailu.	37
Kuvio 6:	CAV7 seulontakierrosten 1-3 välinen vertailu.	37

Liitteissä:

Kuvio 7: CAV7 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määrittäminen tehty 20.1.2010) 6

Kuvio 8: CAV7 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määrittäminen tehty 26.2.2010) 6

Kuvio 9: CAV9 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määrittäminen tehty 12.2.2010) 7

TAULUKOT

Taulukko 1: CAV9 puhdistustaulukko

26

KÄYTETYT LYHENTEET

A549	ihmisen keuhkocytopäsolulinja
BSA	naudan seerumin albumiini (bovine serum albumin)
CAV	coxsackievirus A
CAV7	coxsackievirus A7
CAV9	coxsackievirus A9
FCS	vasikan seerumi (fetal calf serum)
HeLa	kohdunkaulansyöpäsolulinja
HPEV1	ihmisen parechovirus 1 (human parechovirus 1)
MOI	virusmäärä verrattuna solumäärään (multiplicity of infection)
PBS	fosfaattipuskuroitu suolaliuos (phosphate buffered saline)
PFU	plakin muodostava yksikkö (plaque-forming unit)
PEG	polyetyleeniglykoli
scFv	yksiketjuinen vasta-ainemolekyyli (single chain variable fragment)
RT	huonelämpötila (room temperature)

1 JOHDANTO

Työn tavoitteena oli optimoida enterovirusten puhdistusmenetelmää ja tarkastella viruksen saantoa puhdistuksen eri vaiheissa sekä käyttää puhdistettuja viruksia vasta-aineiden seulonnassa.

Työssä tuotettiin ja puhdistettiin kaksi enterovirustyyppiä: coxsackievirus A7 (CAV7) ja coxsackievirus A9 (CAV9). Puhdistetuille viruksille yritettiin löytää vasta-ainekirjastosta uusia sitoja. Tutkimuksessa havaittiin, että puhdistusprosessissa häviää huomattava määrä virusta tai sen infektiivisyys alenee merkittävästi etenkin PEG-saostuksen aikana. Virusta yritettiin konsentroida pienempään tilavuuteen käyttäen ultrasuodatusta vaihtoehtona PEG-saostukselle. Vaikka viruksen ei pitäisi teoriassa läpäistä 1000 kDa:n huokoskoon kalvoa, suurin osa viruksista kuitenkin teki näin. Käytettäessä 300 kDa:n kalvoa havaittiin, että virus pysyi kalvon pinnalla ja että virus puhdistui suodatuksen aikana. Tutkimuksen perusteella 300 kDa:n kalvo on soveltuva sekä viruksen osittaiseen puhdistukseen että konsentroituihin. Osittainen puhdistus ja konsentointi on siten mahdollista tehdä myös suoraan virusinfektoiduista soluista ilman PEG-saostusta ja CsCl-ajoa.

Tutkimuksen toisessa osassa viruksiin sitoutuvia vasta-aineita seulottiin bakteereissa lisättävästä synteettisestä vasta-ainekirjastosta, joka tuottaa yksiketjuisia vasta-ainemolekyylejä (scFv) faagipartikkelin pinnalla (ns. faaginäyttötekniikka). Faagi-scFv-kirjastoa käytettiin solukuopassa, johon oli immobilisoitu kohdevirus, ja sitoutuneet faagit rikastettiin lisäämällä sitoutuneet virukset bakteerisoluihin ja kierrättämällä niitä uudestaan hiukan eri olosuhteissa viruskuopissa. Spesifiset kloonit identifioitiin ELISA:lla (enzyme-linked immunosorbent assay).

Työn kokeellinen vaihe suoritettiin Turun yliopiston Virusopilla Dos. Petri Suden ohjauksessa. Vasta-ainekirjasto oli valmistettu Turun yliopiston biotekniikan laitoksella ja osa työvaiheista suoritettiin biotekniikalla yhteistyössä FM Janne Leivon kanssa.

1.1 Pikornavirukset

Enterovirusten suku kuuluu lahkon *Picornavirales* heimoon *picornaviridae*. Pikornavirukset ovat hyvin samankaltaisia sekä geneettisesti että rakenteellisesti. Pikornavirusten ryhmään kuuluu tällä hetkellä 12 sukua, jotka ovat *Enterovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* ja *Avihepatovirus* (www.picornaviridae.com). Pikornavirukset ovat pieniä, vaipattomia RNA-viruksia. Pikornavirusten rakenne on ikosaedrinen ja niiden proteiiniuoren pinta koostuu VP1, VP2 ja VP3-proteiineista. Pikornavirukset ovat yleisimpiä taudinaiheuttajia, joten niillä on suuri taloudellinen ja lääketieteellinen merkitys. (Ylä-Pelto, J.; & Susi, P. 2010)

Enterovirukset, joihin myös coxsackievirukset kuuluvat, sisältävät kymmeniä ihmiselle patogeenisiä tyyppejä. Antigeenirakenteeltaan lähisukuisia viruskantoja kutsutaan serotyypeiksi. Ihmisessä tautia aiheuttavat enterovirusserotyypit jaotellaan perinteisesti polioviruksiin, coxsackie A –viruksiin ja coxsackie B –viruksiin. Nykyisin käytössä olevassa, geneettisin perustein tehdyssä, jaottelussa enterovirukset ryhmitellään seitsemään lajiin, ihmisen enteroviruksiin A-D (HEV A-D) ja ihmisen rinoviruksiin A-C. (Hyypiä ym. 2010)

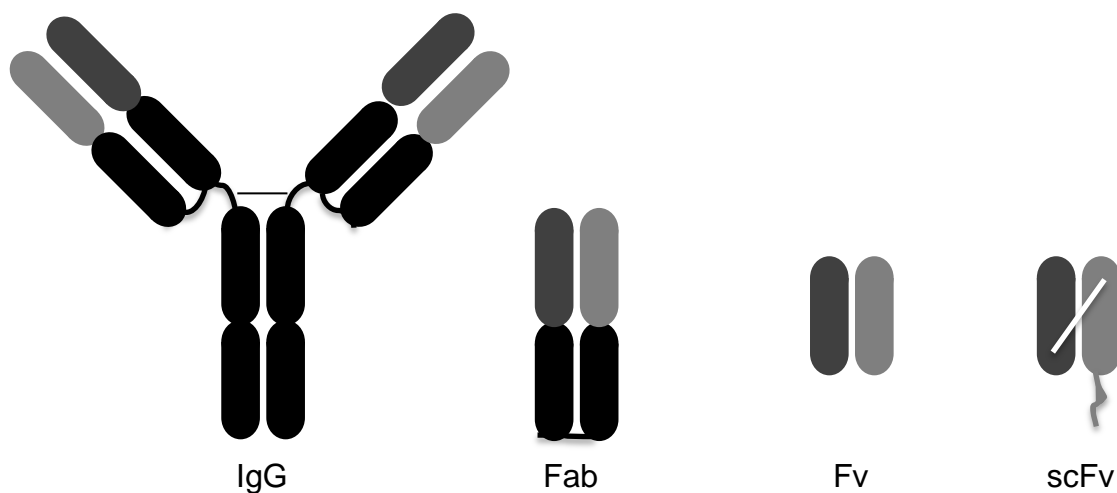
CAV7 ja CAV9 ovat molemmat pikornaviruksiin kuuluvia, ihmiselle tautia aiheuttavia enteroviruksia. Coxsackievirus A7 (CAV7) on yksi HEV A-lajin serotyyppi. CAV7 on aiheuttanut mm. aivokalvontulehdusta ja halvauksia. Kirjallisuudessa tunnetaan kolme CAV7-kantaa: Parker, USSR ja 275/58. Parker- ja USSR-kannat on eristetty halvauspotilailta, 275/58-kanta aivokalvontulehduspotilaalta. (Whitton ym. 2005. Nature Reviews)

Coxsackievirus A9 (CAV9) on yleinen ihmispatogeeni, joka aiheuttaa lievien hengitystieinfektioiden lisäksi mm. sydänlihaks- ja aivokalvontulehduksia. (Cui ym. 2010. Virology Journal)

1.2 Vasta-ainekirjasto

Työssä käytetyn vasta-ainekirjaston geenit oli kloonattu synteettisesti ja kirjastoa oli muokattu siten, että kirjastosta tuottui suuri määrä erilaisia vasta-aineita. Bakteriofageja käytettiin vasta-aineiden tuottamiseksi bakteerisoluissa.

Vasta-aineet ovat suuria valkuaisaineita eli glykoproteiineja, joita kutsutaan yhteisnimellä immunoglobuliinit. Kaikkien vasta-aineluokkien immunoglobuliineilla on sama perusrakenne, johon kuuluu neljä polypeptidiketjua, joista kaksi on identtistä kevyttä (L-) ketjua, ja kaksi identtistä raskasta (H-) ketjua. Ketjut ovat kiinnittyneet toisiinsa disulfidisidoksin. Fv-molekyylä (vaihteleva alue) koostuu H-ketjun (raskaan ketjun) neljänneksestä ja L-ketjun (kevyen ketjun) puolikkaasta, jotka pysyvät yhtenäisenä palana epäkovalenttein sidoksin. Kuvassa 1 on esitetty vasta-ainemolekyylin rakenne sekä vasta-ainefragmenttien rakenteita. Vasta-aineet tarttuvat Fv-palan välityksellä antigeeniin, jonka takia Fv-palojen polypeptideissä on satoja erilaisia aminohapposekvenssejä. (Pini, A. & Bracci, L. 2000)



Kuva 1: Kokonainen vasta-ainemolekyylä (IgG) ja vasta-ainefragmenttejä (Fab, Fv ja single chain Fv). (Pini, A.;& Bracci, L. 2000)

Kloonaamalla vain vasta-aineen vaihtelevat geenit, pystytään tuottamaan Fv-fragmenttejä. Fv-osaset saattavat kuitenkin irrota toisistaan, mikä johtuu

kovalenttisten sidosten tai muiden disulfididisidosten puutteesta kahden ketjun välillä. Yhdistävän peptidiä koodittavan geenin sijoittaminen VH- ja VL-geenien väliin mahdollistaa yksiketjuisen (single chain) Fv-fragmentin ilmentymisen. scFv-molekyyli ei esiinny luonnossa, mutta se on stabiilimpi kuin Fv-molekyyli ja sisältää kuitenkin sen vasta-ainespesifisyyden ja laskostuksen. (Pini, A.; & Bracci, L. 2000)

Luonnollista immunitetiijärjestelmää on mahdollista jäljitellä ilmentämällä vasta-ainefragmenttia faagipartikkelin pinnalla. Vasta-ainekirjastot seulotaan faaginäyttötekniikalla, jossa käytetään kolmea seulontakierrosta parhaiden sitojien rikastamiseen. Puhdistettuja viruksia käytetään rikastettujen kirjastojen seulontaan.

1.3 Faaginäyttötekniikka

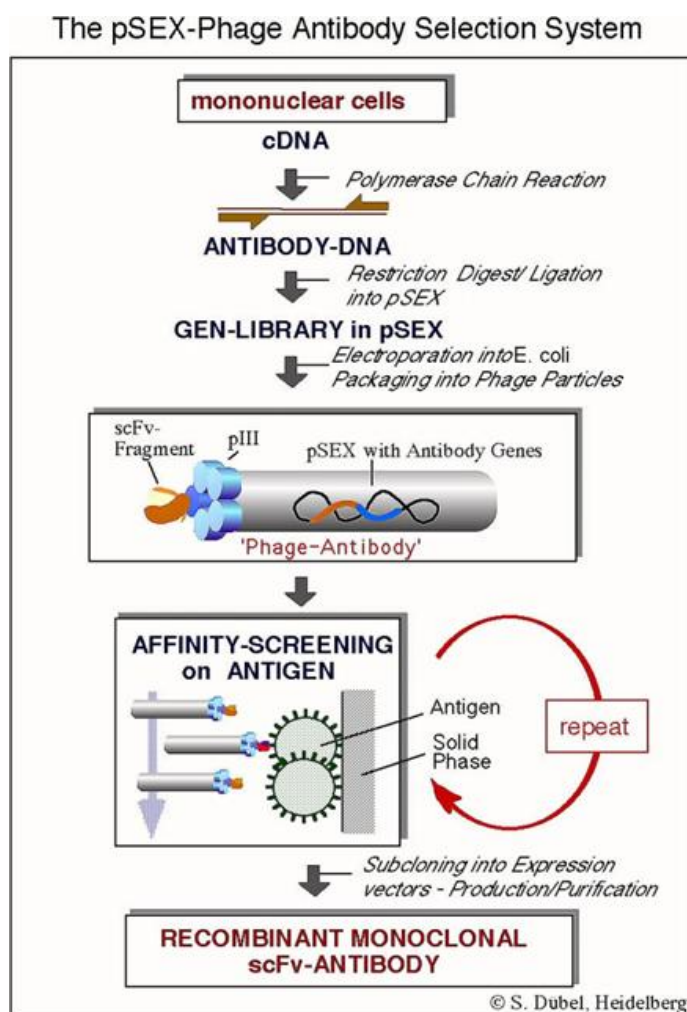
Faaginäyttötekniikka on keskeinen menetelmä seulottaessa uusia sitoja sitojakirjastoista. Menetelmässä halutun proteiinin sekvenssi insertoidaan vektoriin, josta sitä tuotetaan fuusioproteiinina faagin kuoriproteiinin kanssa. Fuusioproteiini pakkautuu faagiin sen rakentuessa, jolloin fuusioproteiini ilmentyy faagin pinnalla. Vektori-DNA, joka koodaa proteiinia, pakkautuu yksinauhaisena faagin sisään, jolloin faagin fenotyyppi on yhteydessä genotyyppiin. Geenejä pystytään siten rikastamaan faagikirjastosta proteiinin ominaisuuksien perusteella (Kuva 2). (Leivo, J. 2008)

Työssä käytettiin *E. coli* M13-filamenttifaagia, joka soveltuu vasta-aineiden näyttöön. Työssä käytetty humaanivasta-ainekirjasto oli valmistettu Turun yliopiston Biotekniikan laitoksella MolBind-projektissa ja sen runkona toimi scFv vasta-aineseqvenssi. Vasta-ainekirjasto oli rakennettu pIXpAK100-vektoriin ja valmistetun kirjaston laajuus oli $3,11 \times 10^{10}$. (Leivo, J. 2008)

M13-filamenttifaagin proteiinkuori muodostuu noin 2700 kappaleesta geeni VIII:n koodaamaa pVIII-proteiinia sekä filamentin päissä olevista pIII-, pVI- ja pIX-proteiineista. Tavallisesti tutkittavaa proteiinia tai sen osaa koodaavaa

geeniä liitetään joko pIII- tai pVIII-geeniin, jolloin faagin proteiinivaippaan syntyy vierasta proteiinia sisältäviä fuusioproteiineja. Täten faagin pinnalle tuotettu kohdeproteiini on fyysisesti kytkeytynyt faagin sisällä olevaan sitä koodaavaan geeniin. (Suominen, I. ym. 2010)

Kuvassa 2 on esitetty faaginäyttötekniikkaan perustuvan vasta-aineseulonnan periaate.

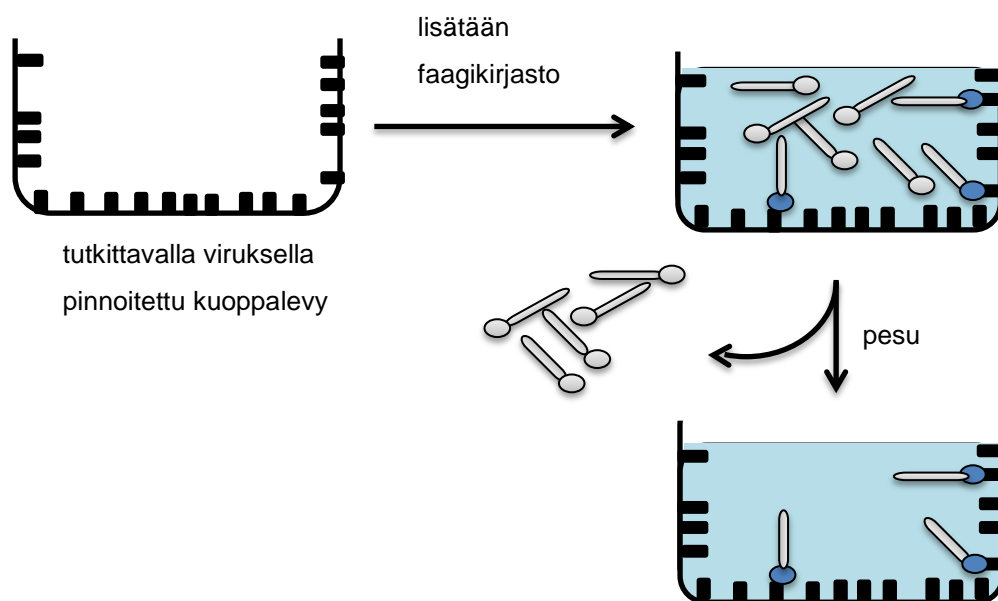


Kuva 2: Faaginäyttötekniikkaan perustuvan vasta-aineseulonnan periaatekuva (Dubel & Heidelberg).

Antigeenispesifiset kloonit rikastetaan sitoutumisella immobilisoituun antigeeniin, jota seuraa sitoutuneiden faagien eluutio ja monistus. Muutamien

sitoutumisselektioiden (pännäysten) jälkeen (Kuva 3), spesifiset kloonit identifioidaan ELISA:lla (enzyme-linked immunosorbent assay).

Pännäyksessä kohdeproteiini kiinnitetään (immobilisoidaan) kuoppalevyn kuoppiin. Vasta-aineen epäspesifinen sitoutuminen estetään täyttämällä kuopan tyhjät kohdat blokkaukspuskurilla. BSA:ta (naudan seerumin albumiinia) tai puskuriin liuotettua rasvatonta maitojauhetta käytetään usein blokkaukspuskurina. Kuoppiin annostellaan tämän jälkeen faagikirjastoa sisältävä liuos ja faagipartikkelit, joihin liittynyt proteiini sitoutuu tarpeeksi lujasti kohdeproteiiniin, jäävät kiinni kuoppaan, kun muut huuhtoutuvat pesuilla pois. (Suominen, I. ym. 2010) Kuvassa 3 on esitetty yksinkertaistettuna pännäyksen periaate.

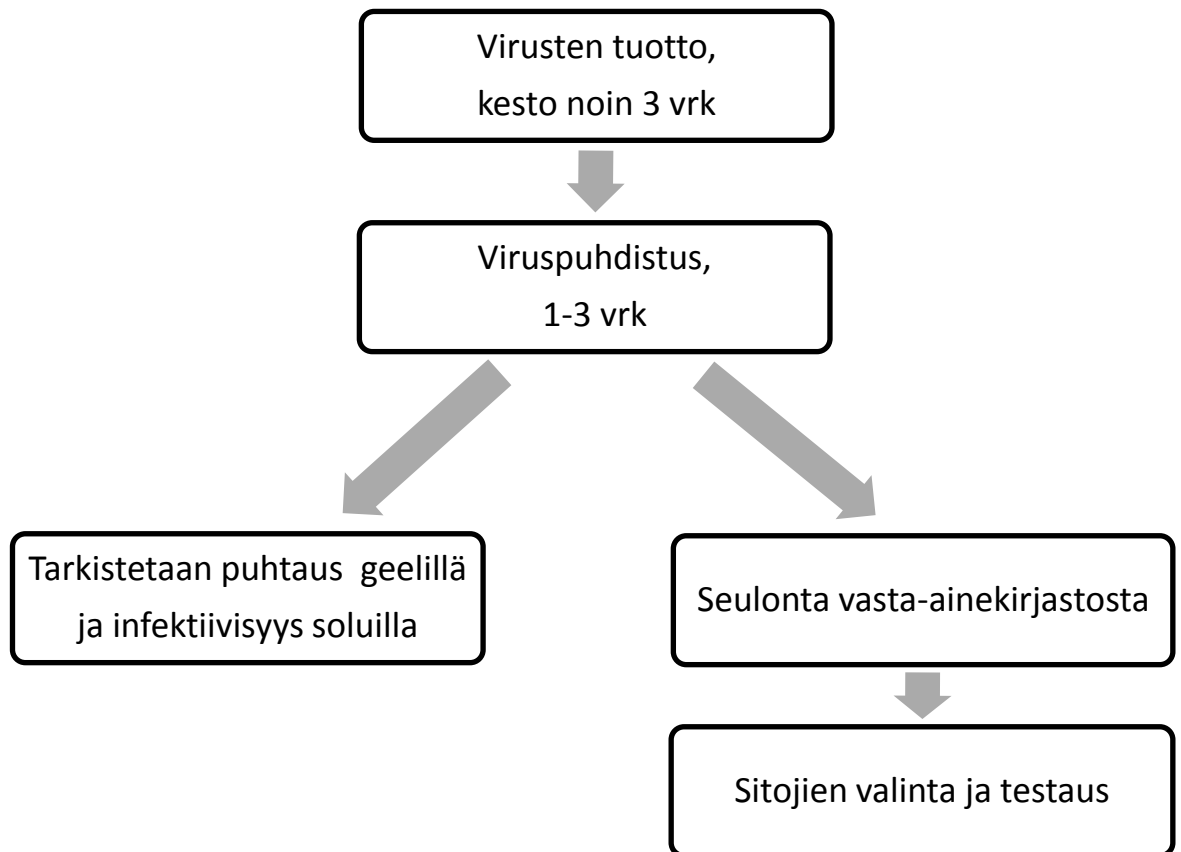


Kuva 3 : Kuoppalevyn pintaan kiinnittyvien fuusioproteiinia ekspressoivien faagien seulonta eli pännäys. (Suominen, I. ym. 2010)

Työssä kohdeproteiinina käytettiin puhdistettua coxsackievirus A7:ää (CAV7) ja coxsackievirus A9:ää (CAV9). Selektioissa sitoutuneet faagipartikkelit eluoitiin talteen ja kerätyt faagit saatiin monistettua infektoimalla niillä soluja, jotka

edelleen tuottivat uusia faageja. Spesifiset sitojat saatiin rikastettua toistamalla keräys-monistussykliä muutamia kertoja.

2 AINEISTO JA MENETELMÄT



Kuvio 1: Kaaviokuva työvaiheista

Opinnäytetyö koostui kahdesta päävaiheesta, joissa ensimmäisessä oli tavoitteena optimoida enterovirusten puhdistusmenetelmää sekä tarkastella viruksen saantoa puhdistuksen eri vaiheissa ja toisessa vaiheessa käyttää puhdistettuja viruksia faagi-vasta-aineiden seulonnassa synteettisistä scFv-kirjastoista. Työvaiheet on esitetty kaaviokuvana kuviossa 1.

2.1 Virustuotto ja puhdistus

2.1.1 Menetelmän periaate

Puhdistusprosessin tarkoituksena oli saada käyttöön vasta-ainetestauksia varten mahdollisimman puhdas ja infektiivinen preparaatti. Viruspuhdistus on aikaa vievä prosessi ja viruksen infektiivisyys heikkenee puhdistuksen aikana. Tarkoituksena oli kerätä preparaatteja puhdistuksen eri vaiheista ja testata niiden infektiivisyys suoralla titrauksella. Solujen pakastuksen ja sulatuksen tarkoituksena oli hajottaa solut ja vapauttaa virus kasvatusliuokseen. Perinteisen tiheysgradienttisentrifugointiin perustuvan Cesiumkloridi-gradientti menetelmän rinnalla kokeiltiin myös ultrasuodatusta virusnäytteen konsentroidiin.

Tiheysgradienttisentrifugointi perustuu soluelimien erilaiseen tiheyteen. Menetelmässä koeputkeen pannaan kerroksittain tiettyä liuosta siten, että pohjalla on suurimmat tiheydet ja pinnalla pienimmät tiheydet, päällimmäiseksi tulee koeliuos. Sentrifugoitaessa koeliuos jakautuu vyöhykkeisiin tiheydensä perusteella ja virusvyöhyke voidaan kerätä talteen, kun tiedetään suunnilleen kohta mihin se muodostuu. (Hiltunen ym. 2010. Tiheysgradienttisentrifugointi. Galenos)

Ultrasuodatus perustuu siihen, että käytettyjen virusten läpimitta on noin 27 nm ja molekyylipaino 10 000 000 Da, jolloin viruksen pitäisi jäädä 1 000 000 Da:n huokoskoon kalvon pinnalle. Muut solunosat läpäisevät kalvon, jolloin virus konsentroituu ja puhdistuu osittain.

2.1.2 Solulinjat

Työssä käytetyt solut kasvoivat kasvatusalustaansa kiinnittyneinä ja kasvatus tapahtui +37 °C:ssa, jossa hiilidioksidipitoisuus oli 5 %. Työssä käytettyjen solujen hoito-ohjeet ovat liitteessä 2 ja työssä käytettyjen liuosten valmistusohjeet ovat liitteessä 1. Työssä käytettiin ihmisen keuhkosyöpä- (A549) ja kohdunkaulansyöpäsolulinjoja (HeLa).

2.1.3 Työn suoritus

Työssä käytetyt virukset puhdistettiin Cesiumkloridi-gradienttimenetelmällä ultrasentrifugilla, jossa virus kerääntyy tiheydensä perusteella sille ominaiseen vyöhykkeeseen. Lopuksi preparaatti dialysoitiin tai konsentroitiin ultrasuodattamalla. Viruspuhdistuksen eri vaiheista kerättiin näytteitä, jotta pystyttäisiin seuraamaan viruksen infektiivisyyden muutoksia puhdistusprosessin aikana. Vaihtoehtoisesti testattiin myös suoraa ultrasuodatusta viruspreparaatin konsentroidiin ja puhdistukseen sulatus-jäädyn jälkeen.

Solujen infektoitihetkellä solumäärän tuli olla noin 80-prosenttisesti konfluentti. Medium vaihdettiin solupulloihin ennen infektiota (Roller-pulloihin noin 30 ml). Solut infektoitiin ennalta määritetyllä määrällä ns. ympyvirusta, jolla saatiin sopiva MOI-arvo (MOI = multiplicity of infection eli virusmäärä verrattuna solumäärään, yleensä 2-10 infektiassa). Virus laimennettiin CAV9 1:300 ja CAV7 1:500. Infektion etenemistä seurattiin päivittäin valomikroskoopilla. Solut kerättiin, kun soluista oli irronneena noin 70-80 % ja loput soluista olivat pyöristyneitä ja irtoamaisillaan. Keräys tapahtui raaputtamalla kasvupintaa, jolloin myös pullon pintaan vielä kiinnittyneet, irtoamaisillaan olevat solut irtautuivat mediumiin. Roller-pullojen sisältö (CAV7: 5 kpl Roller-pulloja, ~150ml ja CAV9: 10 kpl Roller-pulloja, ~300ml) yhdistettiin ja pakastettiin -40 °C.

Pakastetut solut sulatettiin vesihauteessa, jonka lämpötila oli noin +30 °C, samalla sekoittaen. Tämän jälkeen solut pakastettiin uudelleen ja jäädytys-sulatus toistettiin kertaalleen. Solut sentrifugoitiin seuraavaksi 8000 rpm, 20 min, +4 °C. Sentrifugoinnin jälkeen supernatantti PEG-saostettiin, (30% PEG 6000 PBS:ään liuotettuna), yön yli +4 °C:n kylmähuoneessa sekoituksessa. PEG-saoste sentrifugoitiin 6000 rpm, 30 min, +4 °C, jonka jälkeen syntynyt pelletti suspensioitiin TNM-puskuriin. Suspensio siirrettiin Falcon-putkeen ja lisättiin detergentit: 120 µl DOC:ia (0,3% Natriumdeoksikolaatti) ja 0,6% NP-40:tä (6 µl/ml liuoksen tilavuudesta). Suspensiota inkuboitiin sekoituksessa 30 min RT. Tämän jälkeen suspensio sentrifugoitiin 2500 rpm, 5 min, +4/23°C. Viruspuhdistuksen optimoimiseksi käytettiin myöhemmissä puhdistuksissa

+23 °C:n lämpötilaa. Supernatantti ajettiin CsCl-gradientissa, jossa muovisiin ultrasentrifuugiputkiin pipetoitiin pohjalle 5 ml 40-prosenttista CsCl-liuosta, jonka päälle pipetoitiin varovasti 5 ml 15-prosenttista CsCl-liuosta ja päällimmäiseksi noin 2 ml supernatanttia. Sentrifugoitiin ultrafuugilla (LKB 2331 Ultrospin 70) käyttäen SW41-roottori, 30 000 rpm, o/n, +4°C. Putkiin muodostui ajon jälkeen virusvyöhykkeet, jotka kerättiin talteen. Gradientit dialysoitiin ja osa konsentroidiin suoraan käyttäen ultrasuodatuskalvoja. Konsentroidi tapahtui käyttäen aluksi 1000 kDa:n huokoskoon ultrasuodatuskalvoja, jonka jälkeen läpimennyt virusmassa suodatettiin uudelleen 300 kDa:n huokoskoolla. Kalvot pestiin kahteen kertaan PBS+MgCl₂:lla ja lopuksi kalvoista suspensoitiin talteen niihin jäänyt virus PBS+MgCl₂:lla. Kalvon läpäisseestä materiaalista otettiin näytteet. Ultrasuodatusta tehtiin myös suoraan solulysaatista ilman PEG-saostusta ja CsCl-ajoa.

Puhdistusprosessin aikana kerättiin eri vaiheista näytteitä, jotka ajettiin SDS-PAGE:lla. Geelistä voitiin päätellä preparaatin puhtaus ja että puhdistettu proteiini on oikean kokoinen, kun proteiinin paikkaa verrattiin vieressä olevan proteiinistandardin (PageRuler™) proteiinikokoihin.

2.2 Suora titraus

2.2.1 Menetelmän periaate

Suoran titrauksen tarkoituksena on testata viruksen kyky infektoida tietyn solulinjan soluja. Menetelmässä virusta pipetoidaan kuoppalevyn ensimmäiseen kuoppaan tietty määrä, josta virusta laimennetaan seuraaviin kuoppiin laimennossarjana. Virusten infektiivisyyttä ja sytopaattista vaikutusta seurataan haluttu aika vertaamalla infektoituja soluja kontrollisoluihin. Sytopaattiseksi vaikutukseksi eli CPE:ksi kutsutaan virusinfektion soluviljelmälle aiheuttamia solun morfologisia muutoksia, kuten pyöristymistä ja laajentumista

2.2.2 Työn suoritus

Puhdistettujen virusnäytteiden infektiivisyys määritettiin titraamalla puhdistusprosessin eri vaiheessa kerättyjä näytteitä A549-soluille 96-kuoppalevyllä. Infektion leviämistä soluviljelmässä seurattiin päivittäin. Tuloksiin kirjattiin infektion etenemisaste kuopittain ja aika.

Konfluenteille soluille vaihdettiin medium (V_{tot} 100 μl) ennen suoraa titrausta. Rivin ensimmäiseen kuoppaan pipetoitiin 10 μl (ultrasuodatettua CAV9:ää 1 μl) viruspreparaattia ja sekoitettiin. Ensimmäisestä kuopasta pipetoitiin 10 μl liuosta kuoppaan 2 ja jatkettiin 1:10 laimennosten tekoa seuraaviin kuoppiin. Pipettiin vaihdettiin uusi kärki joka kuopan jälkeen ja viimeisestä kuopasta poistettiin 10 μl , jotta kaikissa kuopissa olisi sama tilavuus. Solukontrollit jätettiin ilman virusta ja infektoita inkuboitiin +37 °C:ssa haluttu aika. Infektion etenemistä seurattiin päivittäin valomikroskoopilla. Lopulta kirjattiin ylös infektion etenemisaika vuorokausina ja viimeinen kuoppa, mihin virusinfektion oli tänä aikana edennyt eli end-point.

2.3 SDS-PAGE

2.3.1 Menetelmän periaate

SDS-PAGE eli natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi on analyysi- ja erottelumenetelmä, jossa proteiinit erottuvat koon perusteella ja jonka avulla saadaan selville proteiinien molekyylipaino. Erotteluajo suoritetaan vertikaalisessa kaksiosaisessa polyakryyliamidista valmistetussa slab-geelissä. Ennen ajoa proteiinien konformaatio hajotetaan lisäämällä näytteeseen pelkistävää merkaptoetanolia, joka hajottaa proteiinien rikkisillat sekä anionista detergenttiä, natriumdodekyylisulfaattia (engl. sodium dodecyl sulphate, SDS). SDS-molekyylit aiheuttavat suuren negatiivisen varauksen, joka peittää proteiinien alkuperäisen varauksen alleen, jolloin proteiinit liikkuvat geelissä molekyylipainonsa mukaisesti. Natriumdodekyylisulfaatti (SDS) on detergentti,

joka liuottaa hydrofobiset molekyylit. SDS aiheuttaa proteiinien denaturoitumisen lämmöllä käsiteltäessä. Ajon jälkeen syntyneet vyöhykkeet paikannetaan värjäämällä geelit proteiinia sitovilla väriaineilla, kuten Coomassie blue. Tris toimii puskurina ja glyseroli tekee näytteistä tiheitä, jolloin näyte painuu helpommin pohjalle, eikä leviä ajopuskurin sekaan. (Solunetti [viitattu 31.1.2011])

SDS verhoaa polypeptidiketjut negatiivisella varauksella, joten proteiinit kulkevat geelissä positiivista napaa kohti. Geelin huokosten kokoa voidaan säädellä erotettavien proteiinien koon mukaan. Toisin sanottuna, geelin pitoisuus päätetään sen perusteella, mitä proteiinia halutaan erottaa. Geelin detektioherkkyyteen voidaan siis vaikuttaa geelin pitoisuuden perusteella. (Solunetti [viitattu 31.1.2011])

2.3.1.1 Työn suoritus

Virusnäytteet pipetoitiin eppendorf-putkiin 18 µl, joihin lisättiin 6 µl SDS-puskuria (80 µl puskuria ja 20 µl merkaptoetanolia). Näyteliuoksia inkuboitii +95 °C:ssa 15 minuuttia. Tämän jälkeen näytteet pipetoitiin geelille (10 µl) ja suoritettiin ajo. Proteiinit ajettiin kokoojageelin läpi 140 voltilla, jonka jälkeen erotusajo ajettiin 200 voltin jännitteellä proteiinien ollessa samalla lähtöviivalla. Väriintaman edettyä geelin alareunaan, ajo lopetettiin. Ajopuskurit laitettiin talteen, irrotettiin geeli lasi- ja alumiinioksidilevystä spaattelia ja puskuriliuosta käyttäen. Geelin vasen alareuna merkittiin, jotta tiedettiin miten päin geelin kuuluu olla. Ylägeelin yläosa poistettiin. Geeliä värjättiin 15 min, jonka jälkeen tehtiin värinpoisto. Ensimmäiseen värinpoistoon laitettiin osa värinpoistoliuosta. Toiseen vaiheeseen laitettiin loput värinpoistoliuoksesta ja värjätty geeli jätettiin vetokaappiin suljetussa astiassa. Geelin valmistusohjeet liitteessä 1.

2.4 Vasta-aineen affiniteettipuhdistus

2.4.1 Menetelmän periaate

mK6-vasta-ainetta puhdistettiin A549-soluissa. Affiniteettipuhdistetun vasta-aineen proteiinipitoisuus määritettiin Bradford-menetelmällä. Vasta-aineelle tehtiin sitoutumiskoe CAV9:ään, sillä puhdistettua mK6-vasta-ainetta tultiin käyttämään immunofluorenssissa ensiövasta-aineena CAV9:lle.

2.4.2 Työn suoritus

A549-soluja jaettiin 6-kuoppalevyille noin 500000 per kuoppa ja solut kasvatettiin konfluenteiksi. Solut pestiin kylmällä PBS:llä levyn ollessa jäällä ja fiksattiin 4-prosenttisella PBS:ään laimennetulla formaldehydillä 15 min RT. Solut permeabilisoitiin seuraavaksi 0,2-prosenttisellä PBS:ään laimennetulla Tritonilla 5 min RT ja pestiin tämän jälkeen PBS:llä. mK6-vasta-aineesta tehtiin 1/10-laimennos 3-prosenttiseen BSA:han. Ensimmäiseen kuoppaan lisättiin vasta-ainelaimennos ja inkuboitiin tunnin ajan ravistelijassa. Tämän jälkeen vasta-ainelaimennos siirrettiin toiseen kuoppaan ja inkuboitiin tunti ja seuraavaksi kolmanteen kuoppaan. Lopuksi vasta-ainelaimennos suodatettiin 0,2 µm suodattimella ja lisättiin 0,02 % NaN_3 :a (1/200 liuoksen tilavuudesta 4 % NaN_3).

Bradfordin määityksessä valmistettiin 7 laimennosta, jotka edustivat vasta-aineen arvioitua proteiinkonsentraatiota liuoksessa. Vertailuproteiinina käytettiin BSA:ta (naudan seerumin albumiinia). BSA-liuosten tuloksista tehtiin standardisuora, johon määritettävän proteiiniliuoksen tuloksia verrattiin ja määritettiin konsentraatio. Vasta-aineen proteiinipitoisuudeksi määritettiin Bradford standardisuoralta noin 0,5 mg/ml. Vasta-aineelle tehtiin myös sitoutumiskoe CAV9:ään *in vitro*, jolla haluttiin testata affiniteettipuhdistetun spesifisen mK6-vasta-aineen sitoutuminen viruksiin. Vasta-aineen sitoutumiskoe viruksiin *in vitro* –menetelmäohje liitteessä 5.

Affiniteettipuhdistettua mK6-vasta-ainetta käytettiin immunofluorenssissa ensiövasta-aineena CAV9:lle.

2.5 Immunosytokemia

2.5.1 Menetelmän periaate

Immunosytokemia perustuu immunofluoresenssitekniikkaan, jossa selvitetään spesifisten vasta-aineiden avulla tutkimuksen kohteena olevan proteiinin paikantumista. Yleensä immunofluoresenssitekniikassa vasta-ainevärjäykset tehdään kahdessa vaiheessa, ensiö- ja toisiovasta-aineella. Työssä haluttiin selvittää puhdistettujen virusnäytteiden kulkeutuminen soluun.

Immunofluoresenssitekniikoiden avulla voidaan osoittaa haluttuja antigeeneja fiksatuista soluista käyttämällä vasta-aineita, joihin on liitetty fluoresoiva merkkiaine.

2.5.2 Työn suoritus

Työssä oli tarkoitus seurata fluoresenssimikroskopian avulla cesiumkloridigradienttimenetelmää sekä ultrasuodatusmenetelmää käyttäen puhdistettujen CAV7 ja CAV9 preparaattien kykyä kulkeutua soluun. Virusnäytteet oli kerätty puhdistusprosessin eri vaiheista ja mikroskooppilla pyrittiin hahmottamaan viruksen infektoimiskykyä ja puhtautta. Mikroskooppina käytettiin Turun biotekniikan keskuksen Zeiss Axiovert 200M – fluoresenssimikroskooppia, jossa oli käytössä 10x vesiobjektiivi ja GFP/Alexa488-filtteri.

(<http://www.btk.fi/cell-imaging/instrumentation/fluorescence-microscopes/>)

A549-soluja jaettiin mustille 96-kuoppalevyille 35 000 solua per kaivo. Solut kasvatettiin 80 % konfluenteiksi, jonka jälkeen solut infektoitiin CAV9 puhdistusprosessin eri vaiheissa kerätyillä preparaateilla, sekä CAV7 Parker (011105) preparaattilla, joka on valmistettu Turun yliopiston virusopin

laboratoriossa sakkaroosigradienttimenetelmää käyttäen. Tämän jälkeen solut siirrettiin + 37 °C:een inkuboitumaan 6 tunniksi. Infektiossa käytettiin 6 tunnin aikapistettä, sillä oletettiin, että siinä virukset näkyvät soluissa selkeästi, mikäli kulkeutuminen soluihin on onnistunut. Virusta käytettiin laimennoksilla: CAV9 1:100, 1:1000, 1:10000 ja CAV7 1:110, 1:1100.

Heti aikapisteen jälkeen levyt siirrettiin jälle ja pestiin kylmällä PBS:llä kaksi kertaa, jonka jälkeen solut fiksattiin PBS-liuokseen, jossa oli 4 % formaldehydi huoneenlämmössä ja permeabilisoitiin Triton-X100 –detergentillä. Solukalvon permeabilisoinnin ansiosta vasta-aineet voivat kulkeutua solun sisään ja solun sisäosia voidaan tarkastella.

Kontrolleina epäspesifisen sitoutumisen havaitsemiseksi käytettiin soluja, joissa ei ollut virusinfektiota, mutta värjäys tehtiin sekä ensiö- että toisiovasta-aineella ja osalle vain toisiovasta-aineella. Ensiövasta-aineina käytettiin CAV9:lle affiniteettipuhdistettua mK6-vasta-ainetta, laimennettuna 1:500 ja 1:2000, sekä CAV7:lle spesifistä CAV7 vasta-ainetta, laimennettuna 1:2000. Toisiovasta-aineena käytettiin CAV9:lle Alexa M488 (Invitrogen, mouse A-11001), laimennettuna 1:200, ja CAV7:lle Alexa r488 (Invitrogen, Anti-rabbit A11008), laimennettuna 1:200. Soluille tehtiin myös Hoechst-tumavärjäys helpottamaan solujen löytymistä mikroskoopilla, Hoechst-tumaväri laimennettiin 1:2000. Vasta-aineet ja tumaväri (Hoechst) laimennettiin PBS:ään, jossa oli 3 % BSA. Työ tehtiin liitteen 3 mukaisesti.

2.6 Faaginäyttötekniikkaan perustuva vasta-aineseulonta

2.6.1 Menetelmän periaate

Pännäys tarkoittaa kuoppalevyn pintaan kiinnittyvien fuusioproteiinia ekspressoivien faagien seulontaa. Virus kiinnitettiin eli immobilisoitiin kuoppalevyn kuoppiin, joihin annosteltiin faagikirjastoa sisältävä liuos. Faagipartikkelit, joihin liittynyt proteiini sitoutui lujasti virukseen, kiinnittyvät

kuoppalevyyn ja muut huuhdottiin pesuilla pois. Kiinnittyneet faagipartikkelit eluoitiin ja monistettiin *in vivo* *E. colissa*. Faagien tuottokasvatukset, selektiot faagikirjastosta, kloonien sekvenssoinnin ja faagistokkien valmistamisen suoritti Janne Leivo. Kuviossa 2 on esitetty vasta-aineseulonnan päävaiheet. Vasta-aineseulonnansta on esitetty myös liitteessä 6 yksityiskohtainen kuva (Kuva 9).



Kuvio 2: Kaaviokuva vasta-aineseulonnan vaiheista ja ohjeellisesta aikataulusta

2.6.2 Levyjen pinnoitus

Mikroitiitterilevyille immobilisoitiin antigeeni, joka oli tässä tapauksessa virus, joko CAV9 tai CAV7. Epäspesifinen sitoutuminen estettiin täyttämällä kuopassa olevat tyhjät kohdat 3 % rasvattomalla maitojauheella liuotettuna PBS:ään. Levyjen pinnoituksen jälkeen sitoutumaton ja löyhästi sitoutunut materiaali pestiin pois.

Levyt immobilisoitiin käyttäen viruslaimennosta: CAV7 1:75 ja CAV79 1:25. Laimennosliuoksena eli puskurina käytettiin PBS+MgCl₂:a. Viruspitoisuutta nostettiin viimeisissä selektioissa kymmenkertaiseksi sitojien rikastamiseksi ja kokeiltiin myös korkean pH:n karbonaattipuskuria (0,1 M NaHCO₃, pH 9) PBS:n sijasta.

2.6.3 Sitoutumisselektio

Antigeenipinnoitetut MaxiSorp-kuopat (CAV7 1:75 ja CAV9 1:25) pestiin kertaalleen PBS+MgCl₂:lla, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin faagistokkeja (CAV7 kierros 2 ja CAV9 kierros 1) 50 µl ja 150 µl PBS+ MgCl₂:a. Faagien annettiin sitoutua 30 min hitaassa ravistelussa, huoneenlämpötilassa. Kuopat pestiin kolme kertaa PBS:llä ja kolme kertaa PBST (PBS+Tween). Viimeisen pesun jälkeen sitoutuneet faagit irrotettiin kuopista, lisäämällä kuoppiin 25 µl trypsiiniä. Trypsiinin annettiin vaikuttaa 30 min hitaassa ravistelussa, RT, jonka jälkeen faagit kerättiin kuopista eppendorf-putkiin ja toimitettiin Janne Leivolle jatkokäsittelyä varten (solujen infektointi ja maljaus sekä faagituottokasvatukset).

CAV9-selektio

MaxiSorp-kuopille tehtiin vasta-ainepinnoitus anti-CAV9-IgG -vasta-aineella (mK6), vasta-aine laimennettiin 1:100 PBS:ään, jonka jälkeen laimennosta pipetoitiin 100 µl per kuoppa. Vasta-aineen annettiin sitoutua kuoppaan 60 min hitaassa ravistelussa, huoneenlämpötilassa. Kuopat pestiin kolme kertaa

PBS+MgCl₂-lla, jonka jälkeen kuoppiin lisättiin virus (CAV9, näyte E dialysoitu, taulukko 1.) laimennettuna 1:10 PBS:ään. Viruksen annettiin sitoutua vasta-aineeseen 60 min ravistelussa, huoneenlämpötilassa. Kuopat pestiin, kuten edellä. Faagistokit (selektiokierrokselta 2: pAK200-AMB F 11 Grev x_a/MB scFv Lib(mix), 50 % glyserolissa, 1*E13 tfu/ml, 21.9.2009 HS ja 9pIII R2) lisättiin kuoppiin siten, että pAK200-faagia tuli kymmeneen kuoppaan ja 9pIII-faagia kahteen kuoppaan. Faagien annettiin sitoutua 30 min, hitaassa ravistelussa, huoneenlämpötilassa, jonka jälkeen sitoutumattomat faagit poistettiin pesemällä kuopat kuusi kertaa. Sitoutuneet faagit eluoitiin eli irrotettiin kuopasta lisäämällä kuoppaan 25 µl trypsiiniä ja antamalla sen vaikuttaa 30 min hitaassa ravistelussa, RT, jonka jälkeen faagit kerättiin kuopista eppendorf-putkiin.

2.6.4 Spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla

ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) toimii periaatteessa kuten ei-kilpaileva immunomääritys. ELISA-määrityksessä vasta-aine sitoutuu antigeenin ja alkaalinen fosfataasi (AP) konjugoidun toisen vasta-aineen väliin. Mittaustulosten perusteella pystytään valitsemaan joukko sitojia, joita rikastetaan uusilla seulontakierroksilla.

Menetelmässä antigeenipinnoitetut levyt pestiin kertaalleen, jonka jälkeen kuoppiin pipetoitiin 50 µl AP-scFv-fuusioproteiinia levytä kuoppalevyn vastaaviin kuoppiin ja laimennettiin 150 µl PBS+MgCl₂. Tämän jälkeen inkuboitiin 60 min, hitaassa ravistelussa, RT, jonka jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa PBS+MgCl₂-lla. Kuoppiin lisättiin 50 µl pNPP-liuosta, jota inkuboitiin 37 °C:ssa vähintään 30 min, kunnes kuopissa oli silmin havaittavissa entsymaattinen värinmuodostus. Absorbanssi mitattiin Victor-monileimalukijalla aallonpituudella 405 nm.

2.6.5 Sitojen testaus

Faagistokkien immunoreaktiivisuus testattiin ELISA:aan pohjautuvalla määrityksellä. Menetelmässä antigeenilla pinnoitetut levyt pestiin PBS+MgCl₂:lla, jonka jälkeen levyille lisättiin faagistokkeja 1:10 ja 1:100 laimennoksina triplikaattina. Faagistokkeja inkuboitii kuopissa hitaassa ravistelussa 60 min, RT, jonka jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa. Tämän jälkeen lisättiin 100 µl europium leimattua markkerivasta-ainetta (Anti-M13-IgG) ja inkuboitii 60 min, hitaassa ravistelussa, RT, jonka jälkeen kuopat pestiin kolme kertaa. Kuoppiin lisättiin entsymaattinen liuos (enhancement solution, Delfia), jota inkuboitii 10 min, hitaassa ravistelussa, RT. Lopuksi kuoppalevyt analysoitii mittaamalla levyjen fluoresenssia Victor-monileimalukijalla, jossa mittausaika oli 1,0 sekuntia. Taustan aiheuttamaa fluoresenssia mitattiin pelkällä blokkauspuskurilla pinnoitetuista näytteistä jokaisen mittauksen yhteydessä, mikä huomioitii tulosten laskennassa.

3 TULOKSET

3.1 Viruspuhdistus

Työn ensimmäisessä vaiheessa virukset puhdistettiin Cesiumkloridi-gradienttimenetelmällä ultrasentrifugilla, jossa virus kerääntyy tiheydensä perusteella sille ominaiseen vyöhykkeeseen. Lopuksi preparaatti dialysoitiin tai konsentroitiin ultrasuodattamalla. Viruspuhdistuksen eri vaiheista kerätyistä näytteistä määritettiin puhtaus SDS-PAGE:lla ja infektiivisyys soluilla, jotta pystyttäisiin seuraamaan viruksen infektiivisyyden muutoksia puhdistusprosessin aikana. Vaihtoehtoisesti testattiin myös ultrasuodatusta viruspreparaatin konsentroidiin ja puhdistukseen suoraan solulysaatista sulatus-jäädätyksen jälkeen.

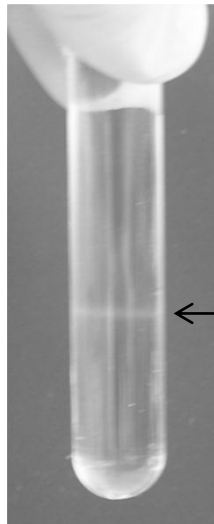
Virustiitteri ilmoitetaan yleisesti muodossa PFU/ml, millä mitataan infektiokykyisen viruksen määrää. PFU/ml –arvon määrittämiseksi olisi kuitenkin pitänyt suorittaa viruksilla plakkititraus suoran titrauksen sijaan, jolloin arvot olisivat olleet vertailukelpoisempia. CAV9-virus ei tuota laskettavia plakkeja käytetyissä A549-soluissa, joten työssä päädyttiin käyttämään suoraa titrausta infektiivisyyden määrittämiseen. Virukselle määritettiin totaali-infektiivisyys (end-point) eli viruspitoisuus viimeisessä kuopassa, johon infektiio oli suorassa titrauksessa edennyt tietyn aikavälin kuluessa.

Taulukkoon 1 on koottu CAV9 puhdistuksen aikana kerätyistä näytteistä kootut informaatiot. Virusmäärä väheni huomattavasti PEG-saostuksessa ja saanto oli vain 7 % alkuperäisestä määrästä. Taulukossa 1 on C- ja E-näytteiden välillä havaittavissa epäloogisuutta, sillä todennäköisesti virus ei säily PEG-saostuksessa kovin infektiivisenä. PEG-saostetuissa soluissa oli myös havaittavissa solujen erilaista hajoamista verrattuna muihin näytteisiin. PEG-saostus vaikuttaa heikentävästi viruksen infektiivisyyteen ja lisäksi PEG-saostuksen jälkeinen tilavuushävikki oli huomattava, sillä hävikki oli noin 92%:n luokkaa PEG-saostuksen jälkeen.

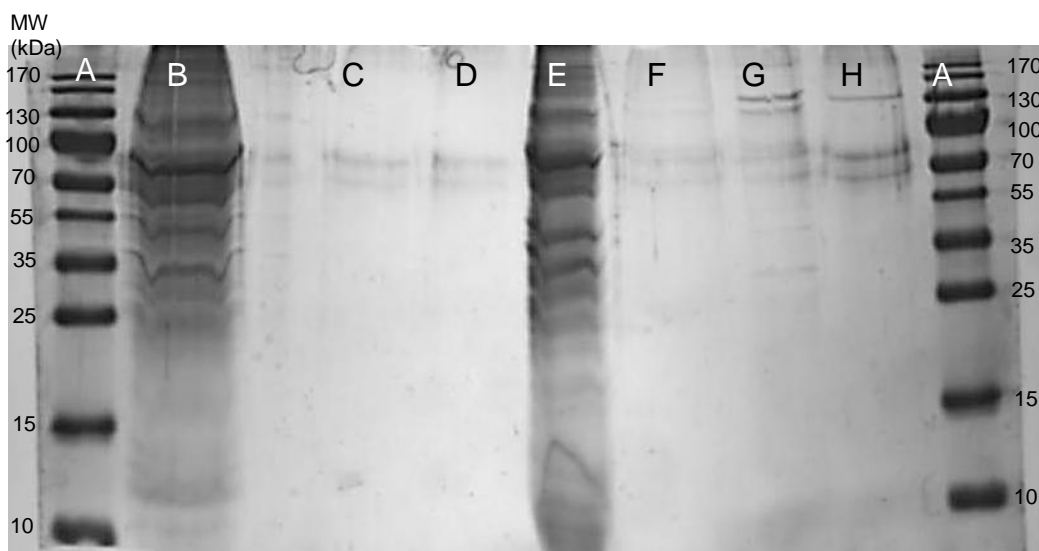
Taulukko 1: CAV9 puhdistustaulukko. Infektiivisyys määritetty 4 vuorokauden kuluttua infektiosta. (A= käsittelemätön preparaatti, B=sulatus-jäähdytyksen jälkeen sentrifugoinnin jälkeen kerätty preparaatti, C=PEG-saostuksen jälkeen kerätty preparaatti, D=tilavuus CsCl-gradientin jälkeen, E=dialysoitu preparaatti, F=ultrasuodatettavan preparaatin tilavuus, G=ultrasuodatettu (300 kDa) preparaatti, H=300 kDa:n ultrasuodatuskalvon läpäissyt preparaatti. Totaali-infektiivisyys on viruspitoisuus viimeisessä kuopassa (end-point), johon infektiio on levinnyt.

	Kokonaistilavuus (ml)	Totaali- infektiivisyys (end-point)	Tilavuus verrattuna lähtötilavuuteen (%)	Hävikki [(V₁-V₂)/V₁]x 100%
A	300	10 ⁻⁷	100 %	0
B	260	10 ⁻⁶	87 %	13 %
C	20	10 ⁻⁶	7 %	92 %
D	6		2 %	70 %
E	4	10 ⁻⁶	1 %	33 %
F	2		0,7 %	50 %
G	0,2	10 ⁻⁶	0,07 %	90 %
H	2	10 ⁻⁴	0,7 %	0 %

Cesiumkloridigradienttiajon aikana virusmassa jäi sille ominaiseen vyöhykkeeseen, josta se kerättiin varovasti pipetillä talteen, kuvassa 4 on havaittavissa muodostunut CAV9-vyöhyke. Vyöhykkeen tilavuudeksi saatiin noin 6 ml, kun kustakin kuudesta putkesta kerättiin noin millilitran verran näytettä, näin pyrittiin samaan virusvyöhyke mahdollisimman hyvin talteen. Virusvyöhyke muodostui kussakin puhdistuksessa suunnilleen samaan kohtaan, kuten kuvassa 4. Kerätyt virusvyöhykkeet dialysoitiin tämän jälkeen, eikä hävikki muuttunut huomattavasti näiden vaiheiden välillä, kuten ei myöskään viruksen infektiivisyyden pitäisi muuttua.



Kuva 4: CsCl-gradienttimenetelmällä saatu CAV9-vyöhyke.



Kuva 5: SDS-PAGE geeli.

Näytteet: A. Kokostandardi. B. CAV9 PEG-saostettu näyte. C. CAV9 dialysoitu näyte. D. CAV9 ultrasuodatettu (300,000 kDa) näyte. E. CAV7 PEG-saostettu näyte. F. CAV7 CsCl-gradienttimenetelmän jälkeen kerätty näyte. G. CAV7 dialysoitu näyte. H. HPEV1 dialysoitu näyte. Kokostandardina PageRuler™ Prestained Protein ladder, #SM0671.

SDS-PAGE proteiinigeelistä (Kuva 5) voidaan karkeasti havainnoida viruspreparaatin puhdistumista. Puhtaimmissa näytteissä on havaittavissa vain virusvyöhykkeet, jotka ovat kuvan perusteella noin 70 kDa:n kokoisia. CAV9:n proteiinien koot ovat kirjallisuudesta saatujen arvojen mukaan: VP1 proteiinilla 34 kDa, VP2 proteiini 29 kDa, VP3 26 kDa ja VP4 7,3 kDa.

Monien proteiinien liikkuvuuteen ja massaan vaikuttaa muitakin tekijät, kuin proteiinin molekulaarinen paino, minkä vuoksi molekulaariseen massaan perustuvaan identifiointiin ei kannata liikaa luottaa.

SDS-PAGE-kuva ei ole oikein looginen, koska samaa näytetyyppiä edustavissa näytteissä on hiukan erilaiset proteiinimäärät. 70 kDa:n proteiinit ovat joko kapsidiproteiinien dimeerejä tai epäpuhtauksia, jotka kulkeutuvat viruksen mukana puhdistuksen aikana, koska kaikissa preparaateissa on samat vyöhykkeet.

Päätelminä viruspuhdistuksesta voidaan todeta, että virusmäärä väheni huomattavasti PEG-saostuksessa ja saanto oli vain noin 7% alkuperäisestä määrästä. Täten pitäisi ehkä kehittää toinen saostusmenetelmä, mikä olisi suotuisampi virukselle.

3.2 Immunosytokemia

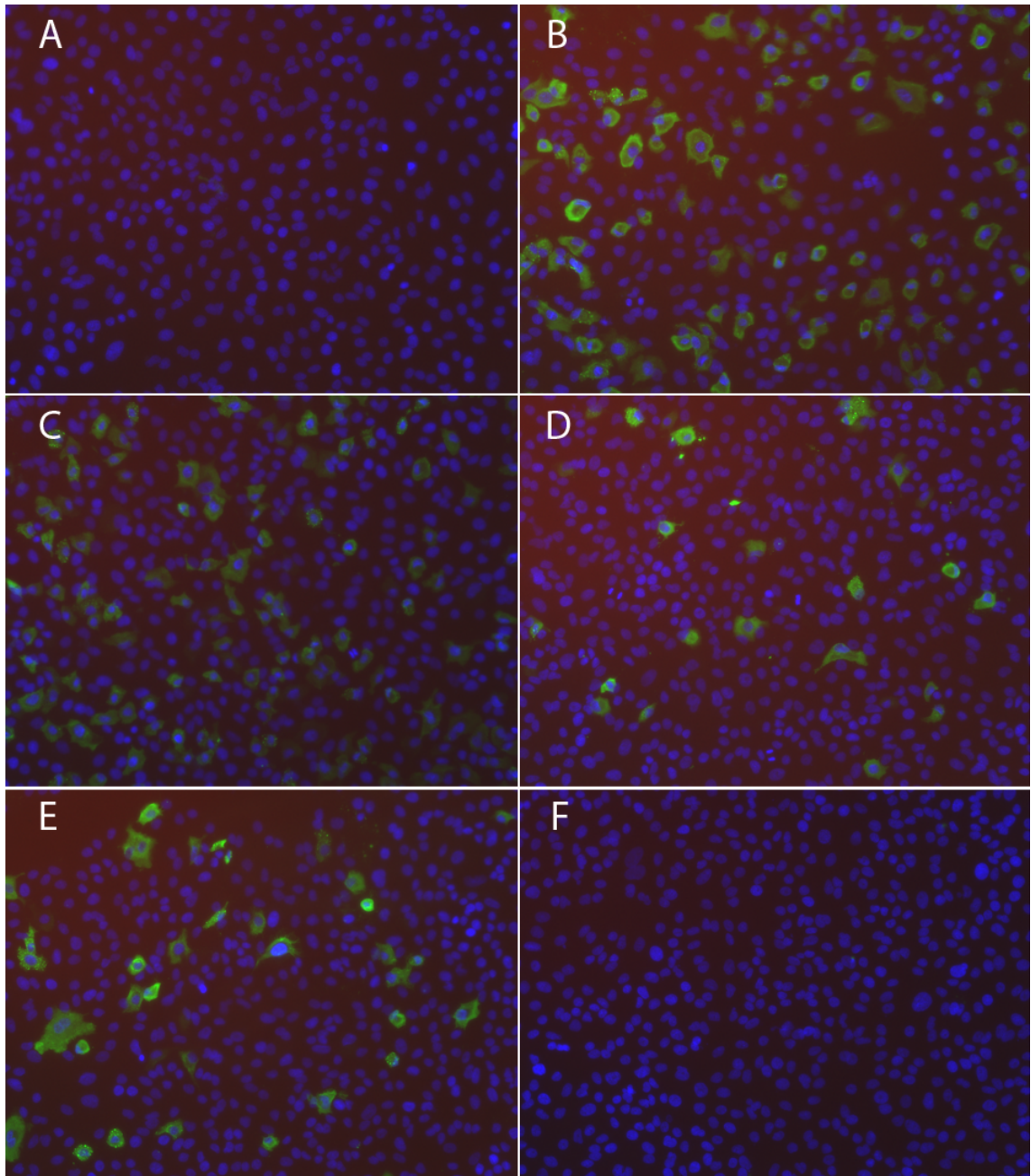
Työssä oli tarkoituksena seurata viruksen kykyä kulkeutua soluun. Mikroskoopilla pyrittiin hahmottamaan viruksen infektoimiskykyä ja puhtautta. Kuvissa 6 ja 7 on nähtävissä CAV9 profiili A549-soluissa ja kuvassa 8 CAV7 profiili A549-soluissa, kuvissa tumat erottuvat sinisinä ja virus vihertävänä. Kontrolleina käytettiin soluja, joissa ei ollut virusinfektiota, mutta värjäys tehtiin sekä ensiö- että toisiovasta-aineella ja osalle vain toisiovasta-aineella. Kuvassa 6 on havaittavissa selkeää virusmäärän väheneminen sulatus-jäädätyksen ja dialysoidun näytteen välillä (Kuva 6, B-D). Kuvasta 6 voidaan myös havaita, että virus ei läpäise 300 kDa:n kalvon huokosia, sillä soluissa ei ole virusinfektioita (Kuva 6, E-F). Vertaamalla kuvan 6 dialysoitua ja ultrasuodatettua näytettä keskenään (Kuva 6, D-E) havaitaan, että ultrasuodatetussa näytteessä on enemmän infektoimiskykyistä virusta, mikä saattaa johtua siitä, että virusmassa on konsentroitunut pienempään tilavuuteen. Tämän perusteella ultrasuodatus 300 kDa:n huokoskoolla käytettäessä Sartoriuksen ultrasuodatuskalvoja, on kelpo menetelmä viruksen konsentrointiin ja osittaiseen puhdistukseen.

A

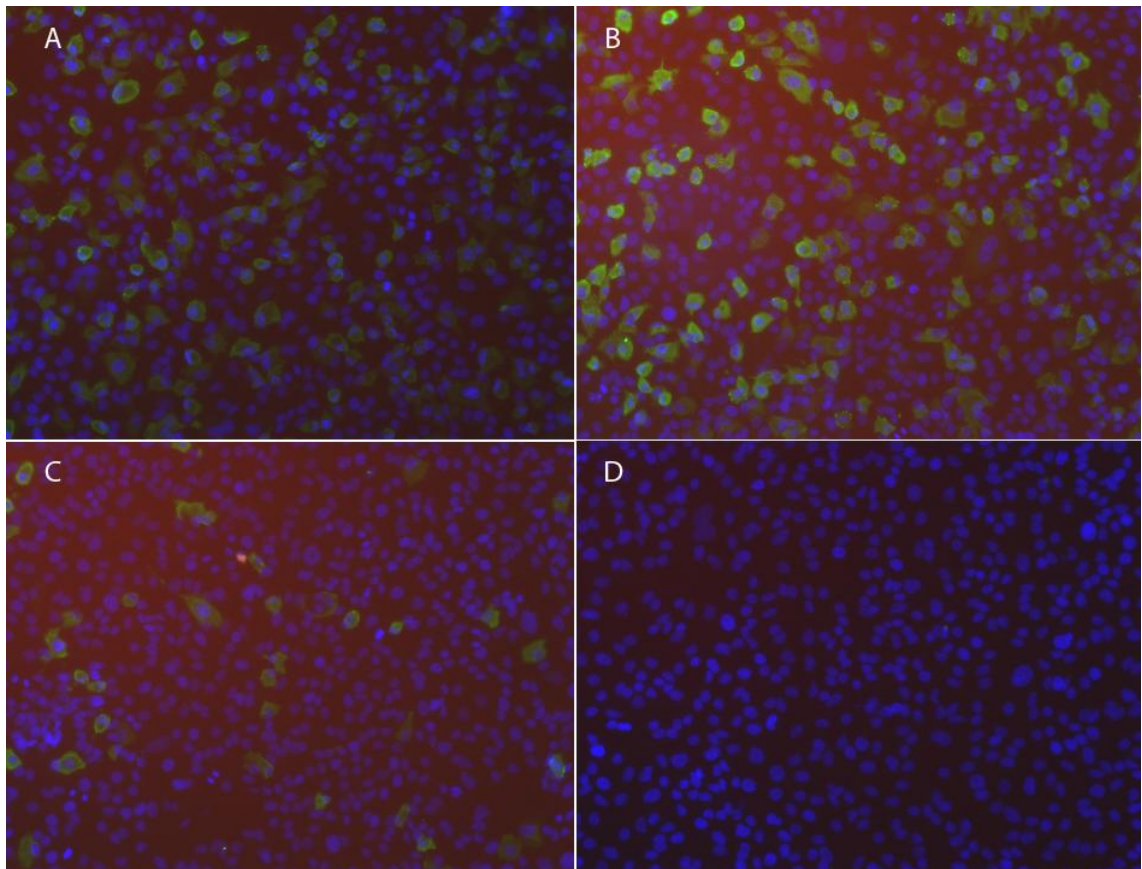
B

E

F

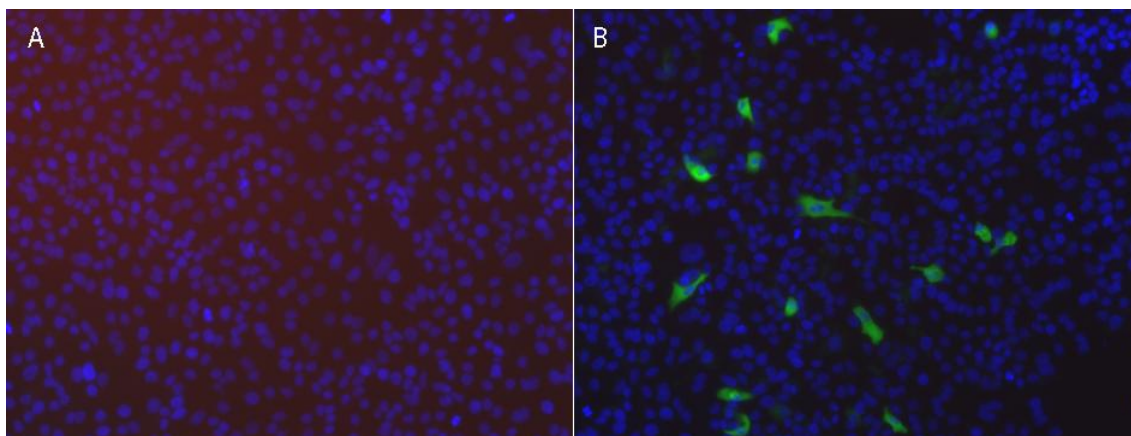


Kuva 6: CAV9-profiili A549-soluissa. A=Kontrollinäyte, jossa soluille tehty värjäys sekä ensiö- että toisiovasta-aineella. B=CAV9 sulatus-pakastuksen jälkeinen näyte. C=CAV9 PEG-saostettu näyte. D=CAV9 CsCl-gradientin jälkeen dialysoitu näyte. E=CAV9 ultrasuodatettu 300 kDa, CsCl-gradientin ja dialyysin jälkeen. F=CAV9 300,000 kDa:n ultrasuodatuskalvosta läpimennyt näyte.



Kuva 7: CAV9-profiili A549-soluissa. A=CAV9 ultrasuodatettu 1 000 kDa:n huokoskoolla. B=CAV9 ultrasuodatettu 300 kDa:n huokoskoolla. C=CAV9 1 000 kDa:n läpäissyt näyte. D=CAV9 300 kDa:n kalvon läpäissyt näyte. (A-D: Suora ultrasuodatus sulatus-pakastuksen jälkeen).

Immunofluoresenssivärjäys kuvien (Kuva 7: B ja D) perusteella pystytään havainnoimaan, että CAV9 jää 300 kDa:n ultrasuodatuskalvon pinnalle, eikä läpäise sitä. Viruksen ei pitäisi läpäistä 1 000 kDa:n huokoskokoa, sillä virus on kooltaan noin 10 000 kDa, mutta näyte kalvon läpäissee liuoksesta paljastaa, että virusta on myös läpimenneessä liuoksessa. Tämä saattaa johtua käytettyjen kalvojen rakenteellisista eroavaisuuksista tai mahdollisesti kalvot ovat saattaneet rikkoutua sentrifugoinnin aikana osittain. Saatujen tulosten perusteella kannattaa ultrasuodatus aloittaa suoraan 300 kDa:n ultrasuodatuskalvoilla, kun käytetään Sartoriuksen kalvoja. Kuvassa 7 näytteet A-D on ultrasuodatettu suoraan sulatus-pakastuksen jälkeen.



Kuva 8: CAV7-profiili A549-soluissa. A=Kontrollinäyte, jossa tumaväri ja seundäärinen (r488) vasta-aine. B=CAV7 (Parker 011105) 1:110 laimennos.

Kuvassa 8 on CAV7-profiili A549-soluissa, samalta kuoppalevyiltä käytettiin muita kuoppia pännäyksessä, joten kuvantamalla haluttiin varmistaa viruksen kulkeutuminen soluun.

3.3 Vasta-aineen sitoutumiskoe

Tulokset eivät juurikaan eronneet taustasta. Viruksen sitoutuminen vasta-aineeseen oli heikkoa. Joko viruspreparaatin infektiivisyys oli heikentynyt tai sitten vasta-aine ei toiminut halutulla tavalla kohdevirukselle. Levyjen o/n + 5 °C immobilisoinnissa virusnäytteet olivat nousseet mikrotiitterilevyn kuopista peitinkalvolle, joka saattoi vaikuttaa levyjen päällystämiseen. Lisäksi työssä on voinut sattua virheitä vaikkakin työ tehtiin täysin työohjetta noudattaen tai sitten jotkin reagenssit ovat saattaneet kontaminoitua.

3.4 Vasta-aineseulonta vasta-ainekirjastosta

Toisen seulontakierroksen sitoja pyrittiin parantamaan nostamalla viruspitoisuutta levyn päällystämässä sekä käyttämällä karbonaatti-puskuria PBS:n sijaan laimennoksissa toisen kierroksen seulonnoissa.

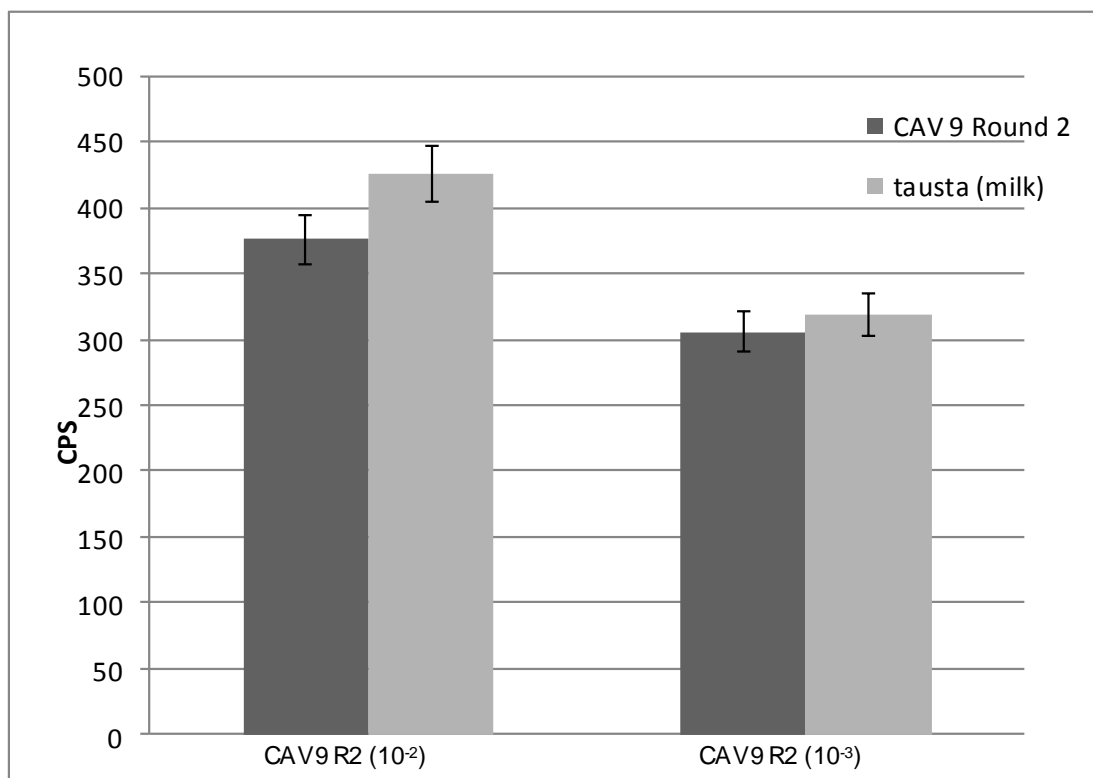
Karbonaattipuskurilla ei havaittu olevan vaikutusta, sillä sitä vertailtiin yhdessä PBS:n kanssa.

3.4.1 Spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla

Liitteessä 6 on mittaustuloksia CAV7 spesifisten kloonien identifioinnista, jossa kuviossa 7 ja 8 on esitetty eri kertoina tehtyjä määrittämiä, joiden perusteella valittiin sitoja jatkokäsittelyyn. Kuviossa 8 on havaittavissa muutamia hyviä sitoja, joiden absorbanssin arvot ovat moninkertaiset verrattuna taustaan, etenkin kuopassa G11 oleva kloon, joka suurella todennäköisyydellä valikoitiin rikastettavaksi uusilla seulonnoilla. Kuviossa 7 tehty määrittäminen jäi opinnäytetyön työvaiheeseen käytettävissä olevan ajan puitteissa viimeiseksi määrittämykseksi. Liitteessä 7 on kuviossa 9 esitetty vastaava kaavio CAV9:n osalta, kuviosta puuttuu tausta-arvot. Tausta mitattiin erilliseltä levyiltä ja taustan absorbanssi asettui noin 0,05-arvoon. Kuviossa 9 on havaittavissa yksi erittäin hyvä sitoja, kloon kuopassa C10.

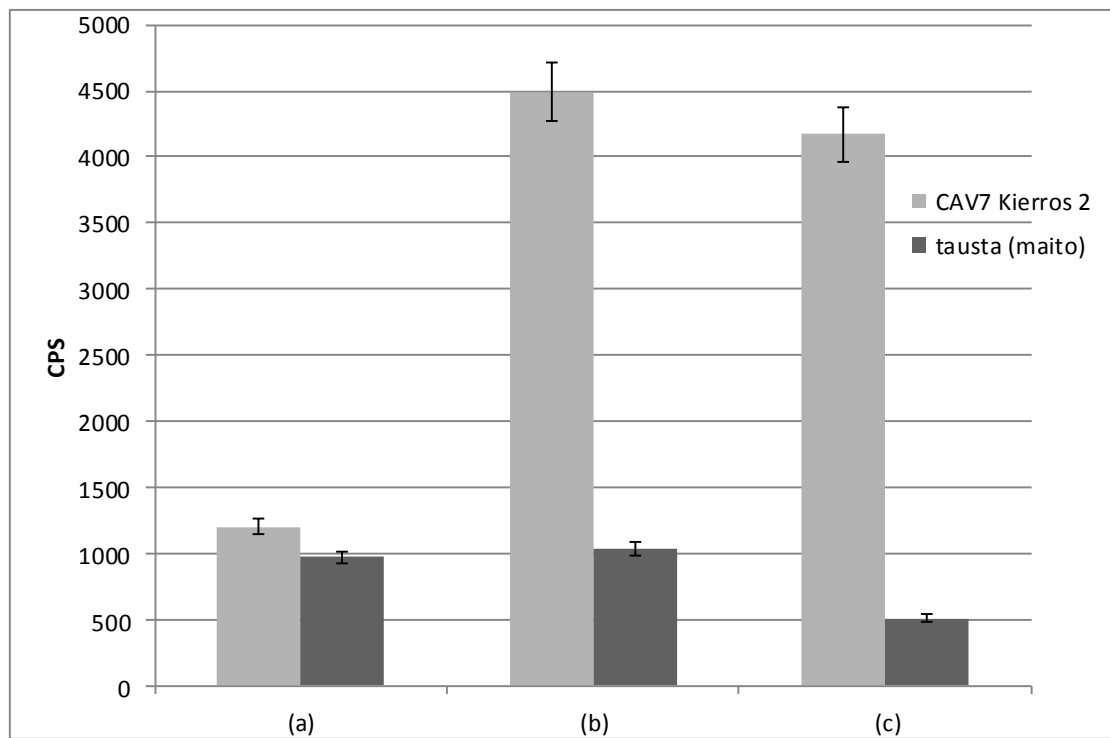
3.4.2 Sitojen testaus

CAV9:llä ei saatu tarpeeksi korkeita mittaustuloksia (Kuvio 3) ja mittausarvot jäivät jatkuvasti taustan alapuolelle, mikä saattoi johtua siitä, että faagipartikkelit sitoutuivat blokkaukseen ja partikkelit kasaantuivat isoiksi ryppäiksi. Kuviossa 3 eri laimennosten väliset erot ovat kuitenkin loogiset. CAV9:lle tehtiin vielä kolmas seulontakierros, mutta tulokset eivät juurikaan poikenneet toisesta kierroksesta. Käytetylle CAV9-preparaatille tehtiin useita testauksia ja infektiivisyys määritettiin soluilla, mutta tästä huolimatta virukselle ei löydetty hyviä sitoja vasta-ainekirjastosta. Tämän vuoksi päädyttiin lopulta jättämään CAV9 pois seulonnoista ja jatkettiin ainoastaan CAV7:llä. Liitteessä 6 on mittaustuloksia joiden perusteella identifioitiin spesifiset kloonit ja siten valittiin sitoja, joita rikastettiin uusilla pännäyskierroksilla.



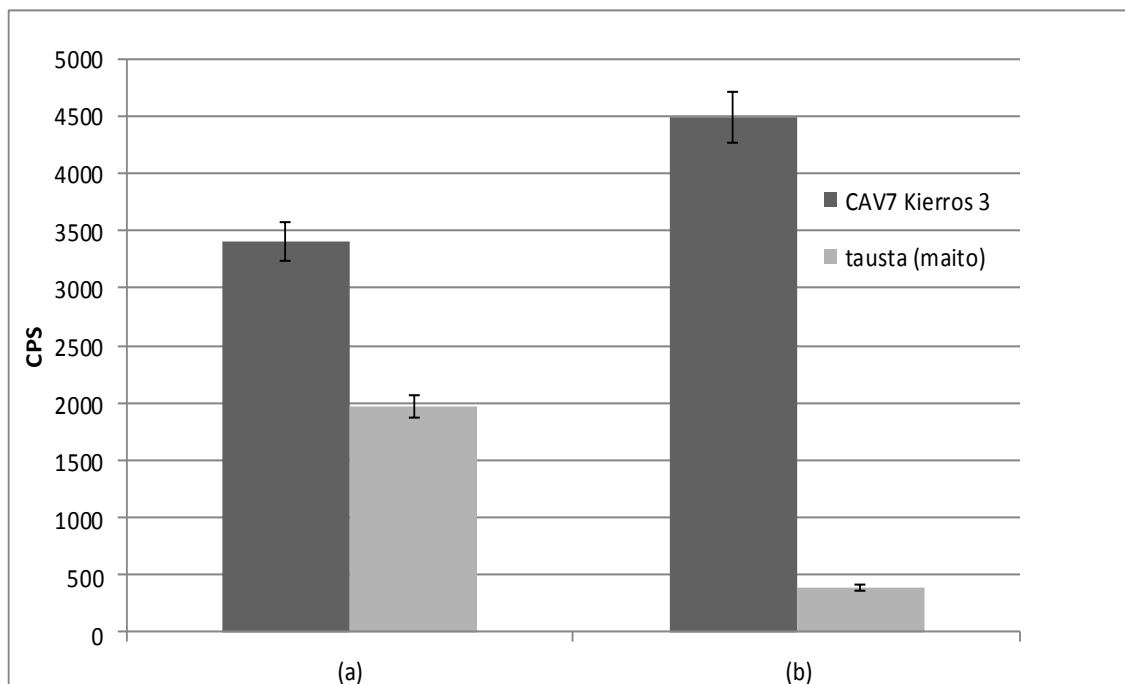
Kuvio 3: CAV9 toisen seulontakierroksen tulosten vertailu eri laimennoksilla.

CAV7:n sitojia testattiin useaan otteeseen ja seulonnoissa palattiin usein lähtöpisteeseen ja tehtiin erinäisiä muutoksia muun muassa puskurin valinnassa ja viruspitoisuudessa, jotta parhaat sitojat saataisiin valikoitua. Vertailussa toisen seulontakierroksen tuloksista (Kuvio 4) voidaan havaita, että ensimmäisellä kerralla tulokset ovat jääneet melko mataliksi, mihin saattoi osaltaan vaikuttaa määrittäjän kokemattomuus ja erinäiset huolimattomuusvirheet tai liian matala viruspitoisuus kuoppien pinnoituksessa.

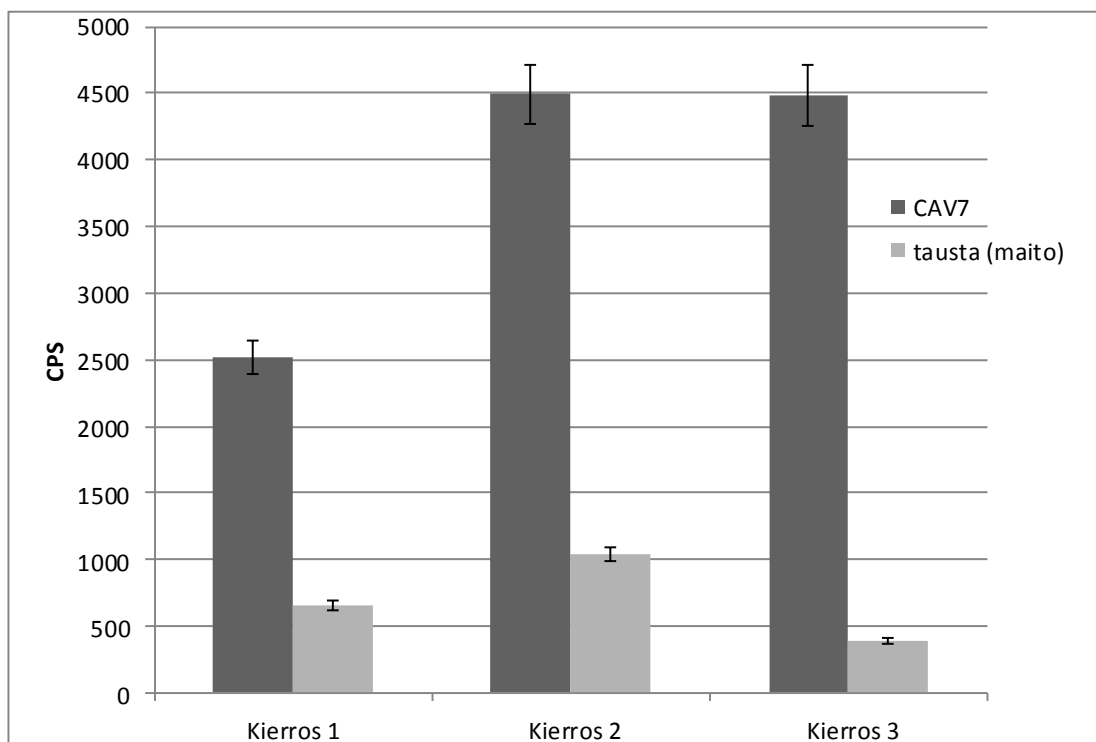


Kuvio 4: CAV7 toisen seulontakierroksen tulosten vertailu.

Kuviossa 5 on esitetty CAV7 kolmannen seulontakierroksen tulosten vertailua. Kuviossa 4 ja 5 esitetyt (a) ja (b) määritykset ovat samaa sarjaa, siten että toisen seulontakierroksen (a) määritys on kuviossa 5 rikastettu kolme kierrosta ja tulosten vertailussa havaitaan selkeää nousu. (b)-määrityksen kohdalla tuloksissa toisen ja kolmannen seulontakierroksen välillä ei ole havaittavissa yhtä suurta nousua.



Kuvio 5: CAV7 kolmannen seulontakierroksen tulosten vertailu.



Kuvio 6: CAV7 seulontakierrosten 1-3 välinen vertailu.

CAV7:llä ensimmäisen ja toisen seulontakierroksen välillä on havaittavissa selkeää ero ja ilmeisesti hyviä sitoja on onnistuttu rikastamaan (Kuvio 5).

Seulontakierroksien vertailussa havaitaan, että sidontakyky nousee huomattavasti toisella seulontakierroksella (Kuvio 6), mutta ei enää niinkään kierroksella kolme.

4 TULOSTEN TARKASTELU

4.1 Viruspuhdistus

Ultrasuodatus nopeuttaisi viruspuhdistusprosessia, kun tarvitaan mahdollisimman infektiivistä viruspreparaattia. Viruksen pitäisi kuitenkin jäädä 1 000 000 Da:n kalvon pinnalle, eikä läpäistä sitä, kuten kokeissa havaittiin, sillä virus on molekyylipainoltaan noin 10 000 000 Da. Tämä tosin saattoi johtua kalvon rakenteellisista muutoksista tai valmistusvirheistä. Käytettäessä Sartoriuksen ultrasuodatuskalvoja, kannattaa ilmeisestä aloittaa ultrasuodatus suoraan 300 000 Da:n huokoskolla, jolloin päästään eroon suurimmassa osasta solunosia. Tässä on kuitenkin vaarana, että kalvon huokokset tukkiutuvat ja rikkoutuvat. Tukkiutumista voitaisiin ehkäistä huuhtelemalla virusmassaa sentrifugointien välissä esimerkiksi PBS:llä.

PEG-saostus vaikuttaa heikentävästi viruksen infektiivisyyteen ja lisäksi PEG-saostuksen jälkeinen tilavuushävikki oli huomattava. Täten pitäisi ehkä kehittää toinen saostusmenetelmä, mikä olisi suotuisampi virukselle. Ammoniumsulfaatti on yleisesti käytetty saostusmenetelmä, joka saattaisi olla potentiaalinen vaihtoehto PEG-saostukselle.

4.2 Vasta-aineseulonta

Vasta-aineseulonnoissa löydettiin viimeisessä CAV7-määrittäyksessä vasta-ainekirjastosta klooneja, jotka sitoivat tehokkaasti CAV7-antigeeneja. Löydettyjä klooneja voisi tulevaisuudessa rikastaa uusilla pännäyskierroksilla. CAV7:lle löydettyjä sitoja voisi rikastaa ja myöhemmässä vaiheessa puhdistaa vasta-aineen testauksia varten. Pikornavirusvasta-aineita voitaisiin testata elävissä soluissa *in vitro* tai hiirissä *in vivo* muun muassa suorittamalla neutralisaatiotestejä ja siten tutkia virusinfektion estoa elävässä solussa. Ihmisvasta-ainekirjastot mahdollistavat virusvasta-aineiden käytön myös ihmisessä.

CAV9 pännäyksestä löydettiin ELISA-määrittelyksellä vain muutamia hyvä sijoja ja näitä pyrittiin rikastaa uusilla pännäyskierroksilla. CAV9-määrittelyksessä havaittu yhden kloonin korkea absorbanssilukema saattaisi myös mahdollisesti johtua kontaminaatiosta tai muusta kuopan pohjalla olevasta epäpuhtaudesta. CAV9-seulonnat aloitettiin myös uudestaan alusta ja viruspitoisuutta nostettiin noin 10-kertaiseksi, mutta näilläkään muutoksilla ei onnistuttu löytää CAV9:lle spesifisiä sijoja. CAV9-määrittelyksissä käytettiin työn ensimmäisessä vaiheessa puhdistettua virusymppiä, jolloin on mahdollista, että sen infektiivisyys on heikentynyt puhdistuksen aikana tai samasta puhdistusvaiheesta kerättyjen näytteiden välillä on eroa. Pakastettujen virusymppien jatkuvat sulatukset testauksia varten saattavat myös heikentää viruksen infektiivisyyttä.

LÄHTEET

Aili Cui, Deshan Yu, Zhen Zhu, Lei Meng, Hui Li, Jianfeng Liu, Guiyan Liu, Naiying Mao, Wenbo Xu. Virology Journal (2010) An outbreak of aseptic meningitis caused by coxsackievirus A9 in Gansu, the People's Republic of China.

Dubel, S. Heidelberg. Expression vectors for surface display and the production of single chain Fv-antibodies - human scFv libraries.

Saatavilla [www-muodossa:](http://www.muodossa:)

<http://www.bbt.tu-bs.de/Biotech/SD/SDprojects.html#express>

Hiltunen, E; Holmberg, P; Jyväskylä, E; Kaikkonen, M; Lindholm-Ylänne, S; Nienstedt, W; Wähälä, K. (2010). Tiheysgradienttisentrifugointi (s. 142). Galenos. WSOYpro Oy, Helsinki

Hyypiä, T. Roivainen, M. Ruuskanen, O. (2010). Pikornavirukset. Teoksessa Hedman, K. Heikkinen, T. Huovinen, P. Järvinen, A. Meri, S. Vaara, M. (toim.), *Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet, kirja 1* (s. 512 - 523). Kustannus Oy Duodecim, Helsinki

J. Lindsay Whitton, Christopher T. Cornell and Ralph Feuer. Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism. Nature reviews 2005

Leivo, J. 2008. Faagityö

Pini, A.;& Bracci, L. (2000). Phage display of antibody fragments. *Current protein and peptide science, Volume 1, Number 2, September 2000.*

Solunetti: Proteiinien SDS-PAGE. [online, viitattu 31.1.2011]. Saatavilla [www-muodossa:](http://www.muodossa:)
http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/proteiinien_sds-page/2/

Suominen, I.;Pärssinen, R.;Haajanen, K.;& Pelkonen, J. (2010). *Geenitekniikka*. Turun ammattikorkeakoulu.

Ylä-Pelto, J.;& Susi, P. (2010). Pikornavirusten käyttö geenivektoreina ja syöpäterapiassa. *Solubiologi-lehti*, 16 - 26.

[online, viitattu 19.5.2011]. Saatavilla [www-muodossa:](http://www.muodossa:)
<http://www.btk.fi/cell-imaging/instrumentation/fluorescence-microscopes>

[online, viitattu 30.4.2011]. Saatavilla [www-muodossa:](http://www.muodossa:)
<http://www.picornaviridae.com>

Liuosten valmistusohjeet

7%FCS+BME+gentamycin

BME	1000 ml
FCS	70 ml
gentamycin	200 µl

7%FCS+HAM F12+gentamycin

HAM F12	1000 ml
FCS	70 ml
gentamycin	200 µl

TNM-puskuri

Tris-HCl	1 ml
NaCl	15 ml
MgCl ₂	33 µl
H ₂ O	84 ml

Fosfaattipuskuroitu suolaliuos (PBS)

10x konsentraatti

NaCl	800 g
KCl	20 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	144 g
KH ₂ PO ₄	24 g
dH ₂ O	10 dm ³

Liuota reagenssit veteen ja täytä lopputilavuudeksi 10 litraa. Yksinkertainen käyttöliuos valmistetaan laimentamalla 10-kertaisesta liuoksesta. Yksinkertaisen käyttöliuoksen pH on 7,4. Liuos autoklavoidaan 121 °C 16 min, jonka jälkeen säilytys huoneenlämpötilassa.

3% BSA PBS-liuoksessa

BSA-jauhe	3 g
PBS	100 ml

Punnitse Bovine albumin-jauhe ja liuota se mittapullossa PBS:ään. Täytä mittapullo merkkiin saakka.

3% Maito PBS-liuoksessa

Rasvaton maitojauhe	3 g
PBS	100 ml

Punnitse maitojauhe ja liuota se mittapullossa PBS:ään. Täytä mittapullo merkkiin saakka.

PBS+1mM MgCl₂

PBS	100 ml
3M MgCl ₂	33 µl

SDS-PAGE geelin valuAlageeli:

4,2 ml H₂O
2,5 ml 4 x Separation buffer (1,5 M Tris, pH 6,8 + SDS)
3,15 ml 40 % Acrylamid/Bis, BIO-RAD
50 µl 10 % APS (ammoniumperoxodisulfat, Merck)
5 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine, Sigma)

Seos suspensoidaan pipetillä ja pipetoidaan lasien väliin. H₂O tulee päälle.
Annetaan jähmettyä 1 h huoneenlämmössä.

Ylägeeli:

1,6 ml H₂O
0,625 µl 4 % Stcking buffer (Tris-HCl pH 8,8 + SDS)
245 µl 40 % Acrylamid
12,5 µl 10 % APS
2,5 µl TEMED

Seos suspensoidaan pipetillä ja pipetoidaan lasien väliin, alageelin päälle.
Asetetaan erottelukampa ja annetaan jähmettyä 1 h huoneenlämmössä.

Soluviljelyssä käytetyt liuokset ja solujen hoito

Solulinja	Kasvatusliuos	Solujen irrotus	Jakosuhte
A549	7 %FCS+HAMF12+gentamycin	0,25%trypsiini/0,02%versene1:1	1:4
HeLa O-S	7 %FCS+BME+gentamycin	0,02% versene	1:10

Kasvata soluja +37 °C:ssa CO₂-kaapissa. Ennen solujen irrotusta huuhtelee solut PBS-liuoksella. Mediumina käytettiin A549 solulle DMEM-mediumia, johon lisätty 7 % FCS ja gentamysiini 0,2ml/1000ml sekä vaihtoehtoisesti HAM F12 – mediumia, johon lisätty 7 % FCS ja gentamysiini 0,2ml/1000ml. HeLa-soluille mediumina käytettiin BME-mediumia, johon lisätty 7 % FCS ja gentamysiini 0,2ml/1000ml.

Solujen fiksaus sekä vasta-aine- ja tumavärjäykset

Pese solut kaksi kertaa jääkylmällä PBS-liuoksella. Poista PBS ja fiksaa solut pipetoimalla kuoppiin 100 µl 4 % formaldehydiä PBS-liuoksessa. Inkuboi 15 minuuttia huoneenlämmössä. Poista formaldehydi ja lisää kuoppiin 100 µl 0,2 % Triton X100 PBS-liuoksessa solujen permeabilisoimiseksi ja inkuboi viisi minuuttia. Poista Triton ja pese solut kaksi kertaa PBS-liuoksella. Lisää soluille 200 µl PBS-liuosta ja varastoi +4 °C:een.

Ennen vasta-ainevärjäyksiä poista kuopista PBS. Tee vasta-ainelaimennokset 3 % BSA:han PBS-liuoksessa. Tee primaarivasta-ainevärjäys (50 µl/kuoppa) ja inkuboi huoneenlämmössä tunti. Poista laimennos ja pese kuopat kolme kertaa PBS:llä. Lisää sekundääristä vasta-ainelaimennosta (50 µl/kuoppa) ja inkuboi tunnin ajan huoneenlämmössä, valolta suojattuna. Pese kuopat kolme kertaa PBS:llä ja tee tarvittaessa tumavärjäys Hoechst-värillä, joka laimennetaan 3 % BSA:han. Lisää Hoechst-värlaimennosta (50 µl/kuoppa) ja inkuboi 10 minuuttia huoneenlämmössä, valolta suojattuna. Toistettiin pesut, kuten edellä ja säilytettiin levyt +4 °C:ssa valolta suojattuna.

Vasta-aineiden sitoutumiskoe viruksiin in vitro

Käytettävät materiaalit:

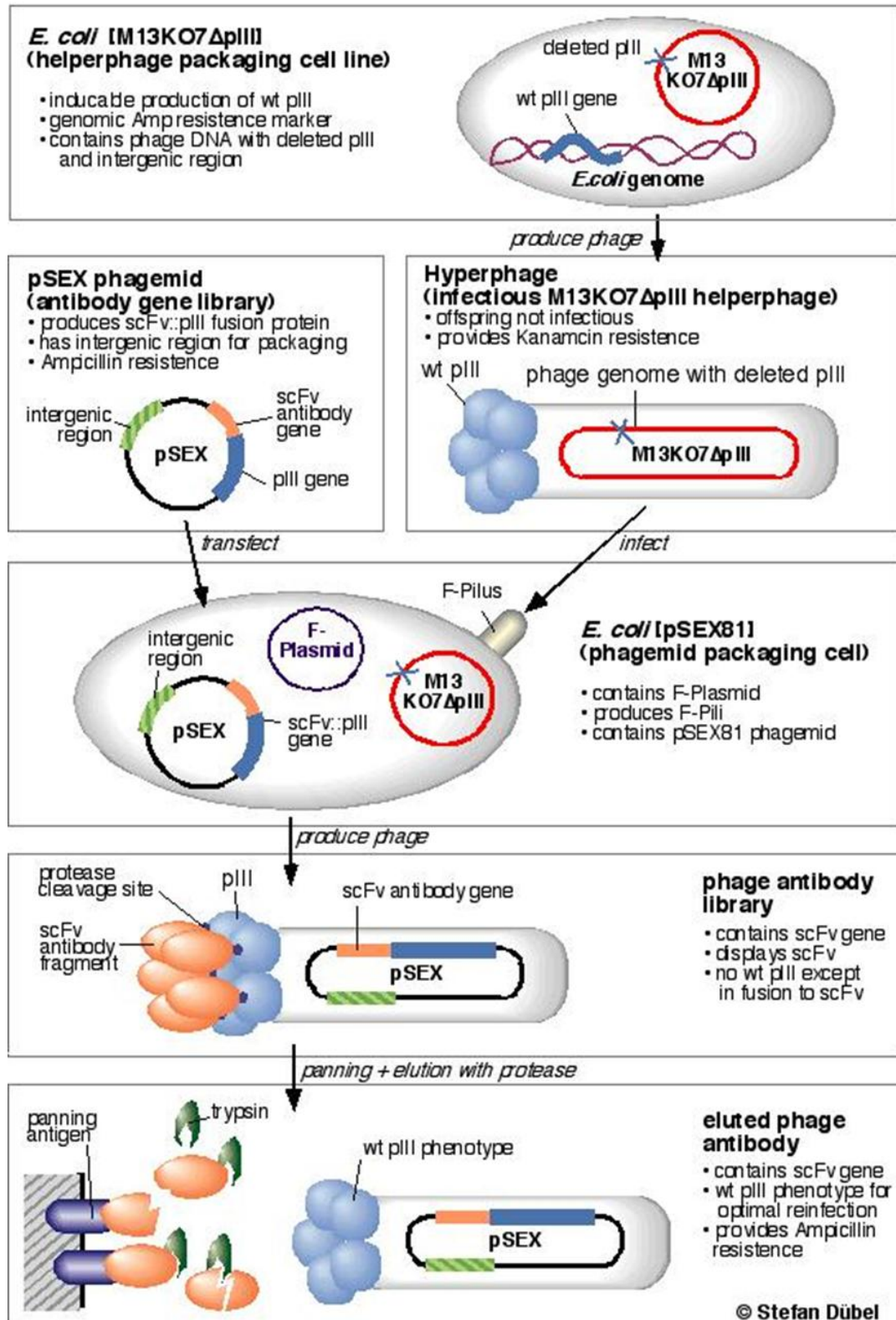
Mikrotiitterilevy: Costar 3590 High binding 96 well

Laimennosneste: 1 % BSA, 1mM MgCl₂, PBS

Pesuliuos: 1 mM MgCl₂, PBS

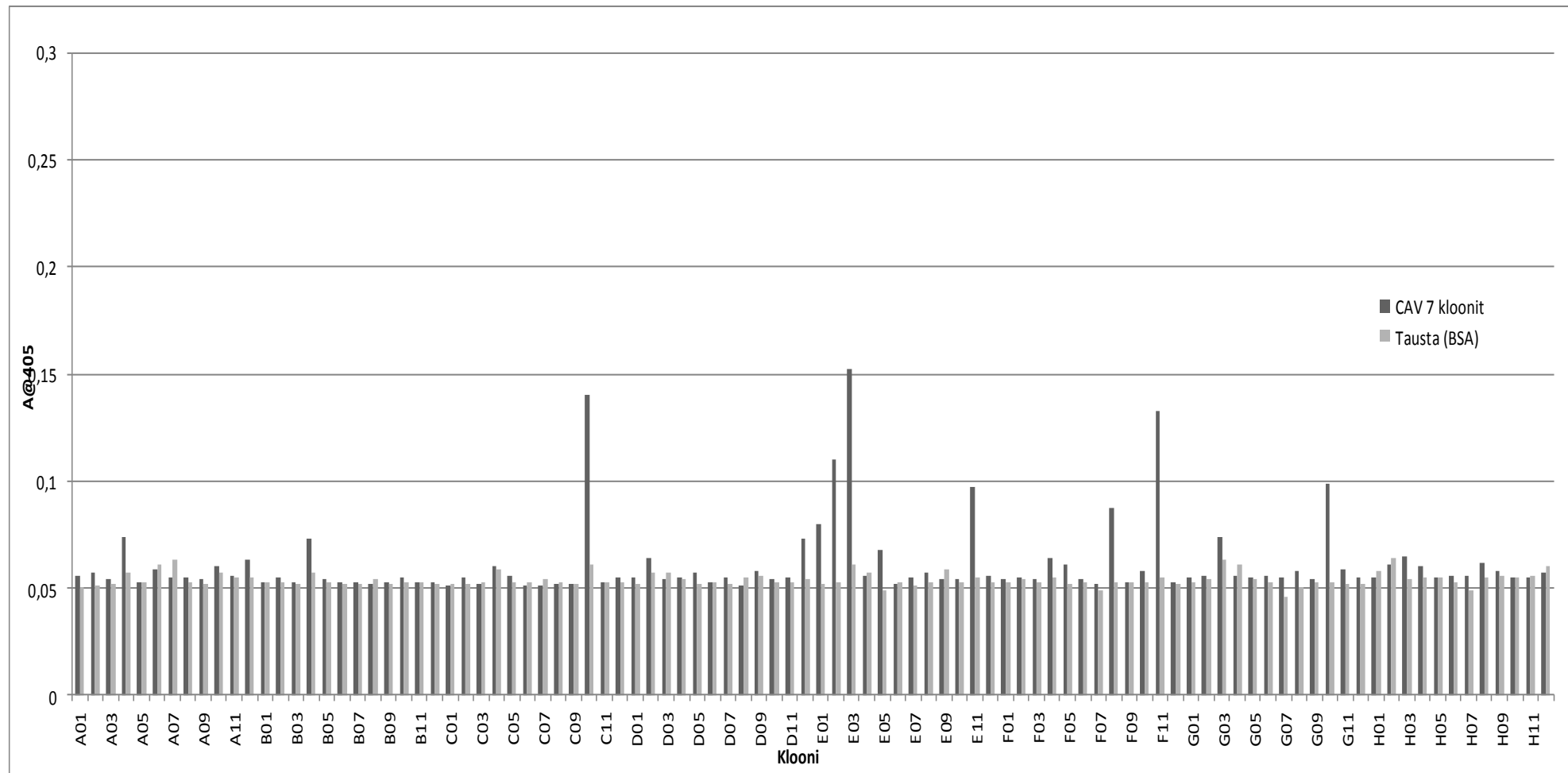
Substraattipuskuri: TMB (tetramethylbenzidine)

Päällystä mikrotiitterilevy halutulla määrällä virusta, käyttäen BSA:ta kontrollina, 50 µl per kuoppa. Tee viruslaimennokset PBS + 1 mM MgCl₂. Inkuboi yön yli + 4 °C. Pese kuopat kolme kertaa PBS + 1 mM MgCl₂, 200 µl / kuoppa. Lisää kuopille 2 % BSA PBS:ssä, jossa mukana 1 mM MgCl₂, 200 µl / kuoppa ja inkuboi 1 tunti huoneenlämpötilassa. Pese kuopat kolme kertaa, kuten edellä. Lisää CAV9-K6-spesifistä antiseerumia laimennuksessa 1:1000 laimennosnesteessä, 100 µl / kuoppa, ja inkuboi 1 tunti huoneenlämmössä. Pese kuopat kolme kertaa. Lisää peroksidaasikonjugoitu (HRP) anti-hiiri vasta-aine (esim. 1:1000 - 1:10 000, 100 µl / kuoppa) ja inkuboi 1 tunti huoneenlämmössä. Pese kuopat kolme kertaa. Lisää TMB-substraattipuskuria 100 µl / kuoppa ja inkuboi valolta suojattuna 5-15 min. Pysäytä reaktio (esim. 0,45 M H₂SO₄) 100 µl / kuoppa. Mittaa OD_{450nm}.

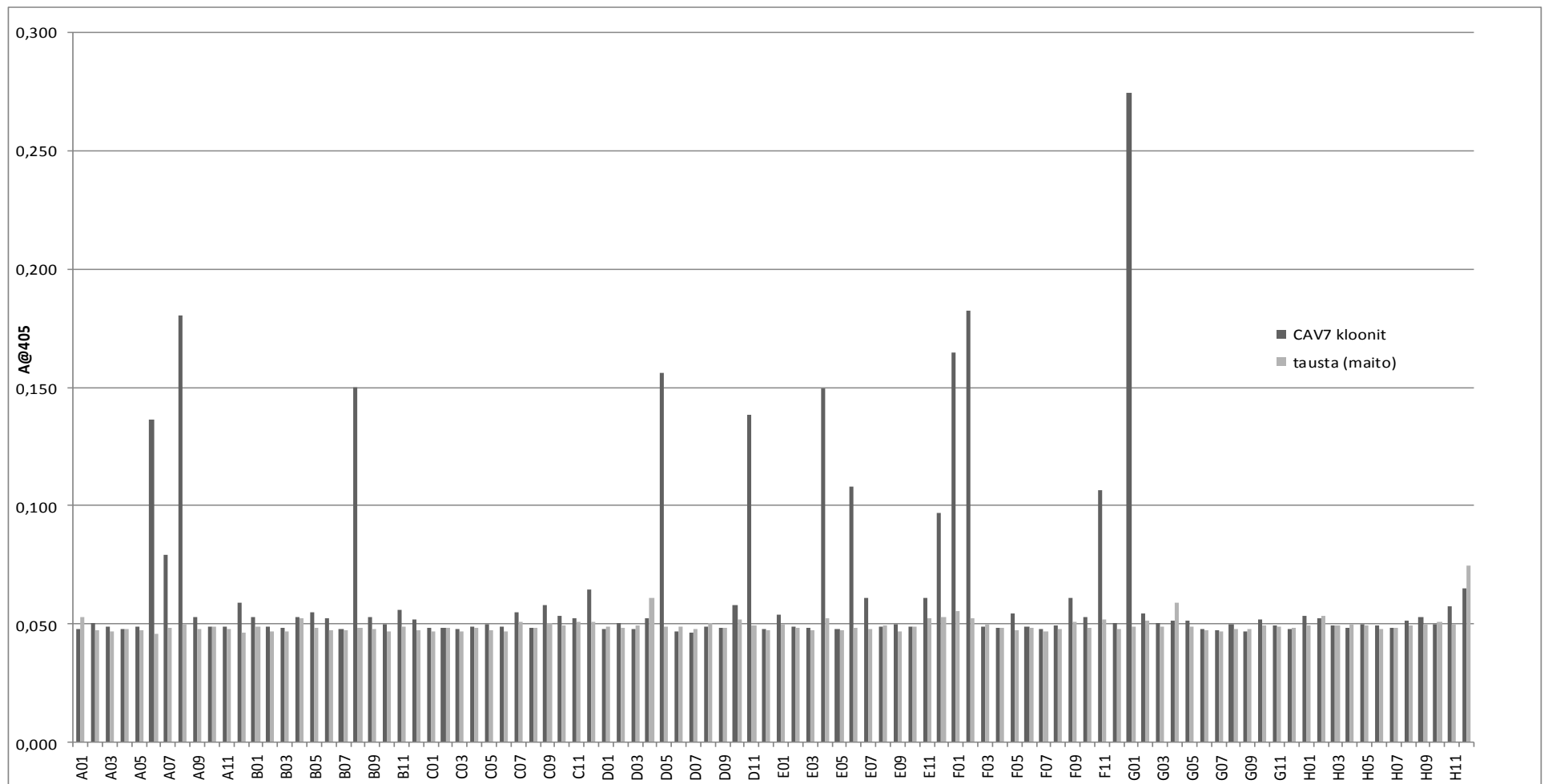


Kuva 9: Vasta-aineseulonnan periaate (S. Dubel)

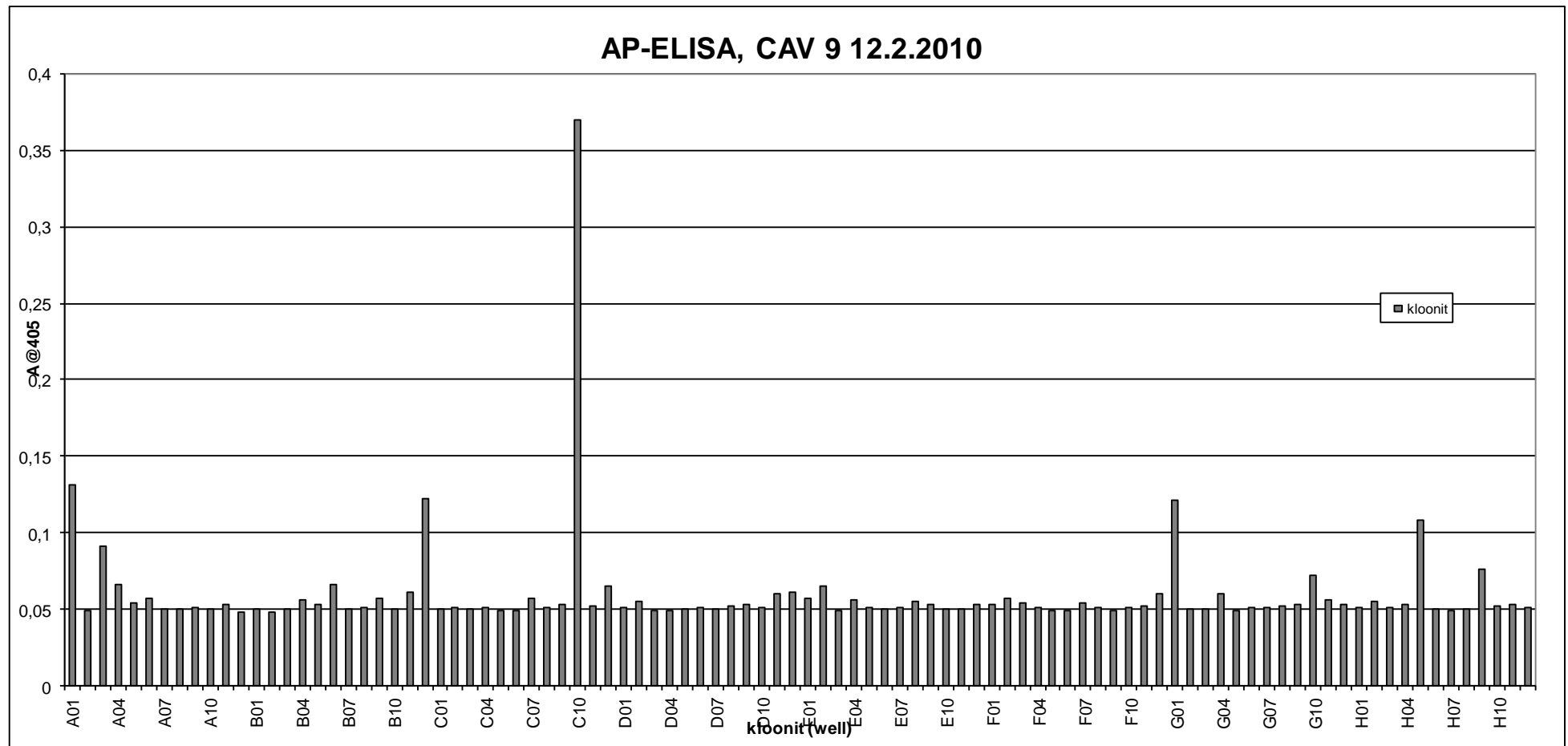
CAV7 spesifisten kloonien identifiointi ELISA:lla



Kuvio 7: CAV7 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määritys tehty 20.1.2010)



Kuvio 8: CAV7 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määritys tehty 26.2.2010)



Kuvio 9: CAV9 spesifisten vasta-ainekloonien identifiointi (määrittäminen tehty 12.2.2010)